

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de la saliva de *Phlebotomus perniciosus* y su potencial  
aplicación en la epidemiología y control de *Leishmania infantum***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Inés Elena Martín Martín**

Directoras

María Isabel Jiménez Alonso  
Ricardo Molina Moreno

**Madrid, 2014**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA SALIVA DE *Phlebotomus perniciosus*  
Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE  
*Leishmania infantum***



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**INÉS ELENA MARTÍN MARTÍN**

**2014**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**



**ESTUDIO DE LA SALIVA DE *PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS* Y SU  
POTENCIAL APLICACIÓN EN LA EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE  
*LEISHMANIA INFANTUM***

Memoria presentada por Inés Elena Martín Martín para optar al grado de Doctora en Farmacia.

Dirigida por los doctores:

**María Isabel Jiménez Alonso y Ricardo Molina Moreno**





**Dña. María Isabel Jiménez Alonso**, Doctora en Farmacia, científica titular de OPIs en la Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Instituto de Salud Carlos III y Profesora Asociada del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y **D. Ricardo Molina Moreno**, Doctor en Biología y científico titular de OPIs en la Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Instituto de Salud Carlos III

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo de investigación titulado: “Estudio de la saliva de *Phlebotomus perniciosus* y su potencial aplicación en la epidemiología y control de *Leishmania infantum*” presentado por la licenciada en Farmacia, Inés Elena Martín Martín, ha sido realizado en el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, 22 de mayo de 2014

VºBº Directores

Dra. María Isabel Jiménez Alonso

Dr. Ricardo Molina Moreno

La interesada

Dña. Inés Elena Martín Martín



La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- **AGL2008-01592/GAN:** La saliva de *Phlebotomus perniciosus* como fuente en la búsqueda de potenciales dianas para el desarrollo de vacunas frente a *Leishmania infantum*.

**Entidad financiadora:** Ministerio de Ciencia e Innovación.

**Duración:** 2009-2011

**Investigador Principal:** Dr. Ricardo Molina

- **AGL2008-01592/GAN:** Biology and control of vector-borne infections in Europe (EDENext Collaborative Project): Sandfly-borne diseases subproject (PBD) (UE, FP7-HEALTH-2010-single-stage, contract N° 261504).

**Entidad financiadora:** UE-FP7

**Duración:** 2011-2014

**Investigador Principal:** Dr. Ricardo Molina

**Coordinador General:** Dr. Petr Volf

así como la concesión de las siguientes ayudas:

- **Beca Predoctoral del Programa de Formación del Personal Investigador (FPI) concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación.** Agosto 2009-agosto 2013. Referencia de la beca: BES-2009-025507. Beca asociada al proyecto AGL2008-01592/GAN.
- **Ayuda para la realización de Estancias Breves dentro del programa FPI,** concedida para la estancia de 3 meses en el laboratorio del Dr. Petr Volf (Laboratorio de Biología de Vectores, Universidad Carlos en Praga) en 2012.



***A mis padres***



## ABREVIATURAS

<b>A<sub>260</sub>, A<sub>280</sub></b>	Absorbancia a 260 y 280 nanómetros, respectivamente
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina) sulfónico
<b>ADA</b>	Adenosina deaminasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>Ag5</b>	Antígeno 5
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CAP</b>	Proteínas asociadas con cisteína ( <i>cysteine associated protein</i> )
<b>CDS</b>	Secuencia de ADN codificante ( <i>Coding DNA Sequence</i> )
<b>CHAPS</b>	3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato
<b>CM</b>	Comunidad de Madrid
<b>c.s.p.</b>	Cantidad suficiente para
<b>CUNI</b>	Universidad Carlos en Praga
<b>DAB</b>	Diaminobencidina
<b>2DE-MS</b>	Electroforesis bidimensional y espectrometría de masas
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>ddNTPs</b>	Didesoxinucleótidos trifosfato
<b>DNasa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>DO<sub>600</sub>, DO<sub>492</sub></b>	Densidad óptica a 600 y 492 nanómetros, respectivamente
<b>DTH</b>	Respuesta de hipersensibilidad retardada ( <i>Delayed type hypersensitivity</i> )
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
<b>EMBL</b>	<i>The European Molecular Biology Laboratory</i>
<b>HLADR</b>	Antígeno leucocitario humano DR
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>IL</b>	Interleuquina



<b>IMAC</b>	Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados
<b>IPG</b>	Gradiente de pH inmovilizado
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-1tiogalactopiranosido
<b>ISCI</b>	Instituto de Salud Carlos III
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LBV</b>	Laboratorio de Biología de Vectores
<b>LC</b>	Leishmaniosis cutánea
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LV</b>	Leishmaniosis visceral
<b>M</b>	Molar
<b>MALDI-TOF</b>	Desorción/ionización mediante laser asistida por matriz -tiempo de vuelo
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitro
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>nm</b>	Nanometros
<b>nl</b>	Nanolitros
<b>OBP</b>	Proteínas de unión a sustancias olorosas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPD</b>	Dihidrocloruro de O-fenilendiamina
<b>PAC1</b>	Adenilato ciclasa pituitaria ( <i>Pituitary Adenylate Cyclase</i> )
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico
<b>PSG</b>	<i>Promastigote secretory gel</i>
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>s</b>	Segundos
<b>SGH</b>	<i>Salivary gland homogenate</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
<b>TEMED</b>	N', N', N', N'- tetrametiletetilendiamina

<b>TI</b>	Tasa de incidencia
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de <i>melting</i> : temperatura a la que el 50% del ADN de doble cadena estará desnaturalizado
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>U</b>	Unidad
<b>UEM</b>	Unidad de Entomología Médica
<b>ufp</b>	Unidad formadora de placa
<b>UTR</b>	Región de ADN no transcrita ( <i>untranslated region</i> )
<b>V</b>	Voltios
<b>V<sub>h</sub></b>	Voltios por hora
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
<b>μA</b>	Microamperios
<b>μl</b>	Microlitro
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>

#### **NOTA:**

Por motivos prácticos, en la redacción de esta Tesis Doctoral no siempre se han utilizado las unidades de medida aceptadas por el Sistema Internacional de Unidades (SI).

A continuación, se indican las correspondencias de las unidades empleadas con las aceptadas por el SI:

mm = 10 <sup>-3</sup> m	kDa = 10 <sup>3</sup> Da
nm = 10 <sup>-9</sup> m	h = 3.600 s
ml = 10 <sup>-3</sup> L	min = 60 s
μl = 10 <sup>-6</sup> L	μA = 10 <sup>-6</sup> A
nl = 10 <sup>-9</sup> L	



# ÍNDICE

<b>SUMMARY .....</b>	<b>1</b>
<b>THESIS SUMMARY FOR EUROPEAN DOCTORATE MENTION .....</b>	<b>3</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1.1 ASPECTOS GENERALES DE LA LEISHMANIOSIS .....	11
1.2 LA LEISHMANIOSIS EN LA CUENCA MEDITERRÁNEA .....	14
1.2.1 AGENTE CAUSAL .....	14
1.2.2 CICLO BIOLÓGICO.....	15
1.2.3 VECTORES IMPLICADOS EN LA TRANSMISIÓN DE <i>L. INFANTUM</i> .....	16
1.2.4 RESERVORIOS DE <i>L. INFANTUM</i> .....	17
1.2.4.1 EL PERRO.....	17
1.2.4.2 OTROS RESERVORIOS DE <i>L. INFANTUM</i> .....	19
1.2.5 EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIOSIS HUMANA EN ESPAÑA .....	20
1.2.5.1 RESEÑA HISTÓRICA .....	20
1.2.5.2 BROTE EPIDÉMICO DE LEISHMANIOSIS EN LA COMUNIDAD DE MADRID.....	22
1.3 LOS FLEBOTOMOS.....	25
1.3.1 IDENTIFICACIÓN Y POSICIÓN TAXONÓMICA DE LOS FLEBOTOMOS .....	25
1.3.2 CICLO DE VIDA .....	27
1.3.3 BIOLOGÍA DEL FLEBOTOMO .....	30
1.3.3.1 LONGEVIDAD Y ESPERANZA DE VIDA.....	30
1.3.3.2 DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT .....	30
1.3.3.3 APAREAMIENTO .....	31
1.3.3.4 DISPERSIÓN Y ALCANCE DE VUELO .....	32
1.3.3.5 ACTIVIDAD .....	33
1.3.3.6 ALIMENTACIÓN.....	33
1.3.4 RELACIÓN PARÁSITO-VECTOR.....	36
1.3.4.1 INCRIMINACIÓN DE VECTORES DE LA LEISHMANIOSIS .....	36
1.3.4.2 PERMISIVIDAD.....	38
1.3.4.3 CICLO INTRAVECTORIAL DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. EN EL FLEBOTOMO.....	38
1.3.4.4 TRANSMISIÓN DE LA LEISHMANIOSIS .....	41
1.3.4.4.1 TRANSMISIÓN VECTORIAL .....	41
1.3.4.4.2 TRANSMISIÓN NO VECTORIAL .....	44
1.3.4.4.3 OTROS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA TRANSMISIÓN DE LA LEISHMANIOSIS .....	45
1.3.4.4.3.1 FACTORES AMBIENTALES .....	45
1.3.4.4.3.2 MANIPULACIÓN DE LA FISIOLÓGÍA DEL VECTOR POR PARTE DEL PARÁSITO.....	45
1.3.4.4.3.3 PSG .....	45
1.4 LA SALIVA DE LOS FLEBOTOMOS .....	46
1.4.1 FISIOLÓGÍA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES .....	46
1.4.2 FUNCIÓN DE LA SALIVA.....	48
1.4.3 COMPOSICIÓN DE LA SALIVA .....	49
1.4.3.1 FACTORES FISIOLÓGICOS QUE DETERMINAN LA COMPOSICIÓN DE LA SALIVA .....	49
1.4.3.2 COMPOSICIÓN DE LA SALIVA.....	52
1.4.3.2.1 ENZIMAS .....	52
1.4.3.2.2 OTRAS PROTEÍNAS .....	56
1.4.3.2.3 NUCLEÓSIDOS .....	62
1.4.3.3 PROTEÍNAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> .....	63
1.4.4 INMUNOLOGÍA DE LA SALIVA.....	65
1.4.4.1 IMPLICACIÓN DE LA SALIVA EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR <i>LEISHMANIA</i> SPP. ....	67

1.4.4.2	EL PAPEL PROTECTOR DE LA SALIVA FRENTE A LA LEISHMANIOSIS .....	70
1.4.4.3	LA SALIVA COMO MARCADOR DE EXPOSICIÓN A LA PICADURA DE FLEBOTOMOS .....	77
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>81</b>
	<b>ESQUEMA DE TRABAJO.....</b>	<b>85</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>87</b>
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	87
3.1.1	FLEBOTOMOS .....	87
3.1.2	VECTORES DE CLONACIÓN .....	87
3.1.2.1	FAGOS .....	87
3.1.2.2	PLÁSMIDOS.....	88
3.1.3	CEPAS BACTERIANAS.....	88
3.1.3.1	MEDIOS DE CULTIVO .....	89
3.2	MÉTODOS .....	89
3.2.1	EXPERIMENTACIÓN ANIMAL .....	89
3.2.2	MANTENIMIENTO DE COLONIAS DE FLEBOTOMOS.....	90
3.2.3	OBTENCIÓN DE LA SALIVA DE FLEBOTOMOS .....	90
3.2.4	ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO DE LA SALIVA DE FLEBOTOMOS MEDIANTE ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL .....	91
3.2.4.1	ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA .....	91
3.2.4.2	COMPARACIÓN DEL PERFIL PROTEICO DE LA SALIVA DE DIFERENTES COLONIAS DE FLEBOTOMOS.....	93
3.2.4.3	COMPARACIÓN DEL PERFIL PROTEICO DE LA SALIVA DE FLEBOTOMOS EN FUNCIÓN DE LA EDAD .....	93
3.2.5	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> (2DE) .....	94
3.2.5.1	PREPARACIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO .....	94
3.2.5.2	ISOELECTROENFOQUE .....	94
3.2.5.3	EQUILIBRADO Y ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA .....	94
3.2.5.4	TINCIONES DE PROTEÍNAS COMPATIBLES CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	95
3.2.5.4.1	TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON PLATA .....	95
3.2.5.4.2	TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON AZUL DE COOMASSIE COLOIDAL.....	96
3.2.5.5	ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS .....	96
3.2.5.5.1	DIGESTIÓN TRÍPSICA DE LAS PROTEÍNAS EN GEL .....	96
3.2.5.5.2	ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	97
3.2.5.5.3	BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS.....	97
3.2.6	DETECCIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS EN LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> .....	98
3.2.6.1	OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES DE RATONES BALB/c, CRICETOS Y CONEJOS FRENTE A LAS PROTEÍNAS SALIVALES.....	98
3.2.6.2	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IgG EN EL SUERO DE LOS ANIMALES INMUNIZADOS FRENTE A LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> , MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA.....	102
3.2.6.3	DETECCIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i> .....	103
3.2.7	OBTENCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> .....	104
3.2.7.1	CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE EXPRESIÓN CON LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> DE MADRID .....	104
3.2.7.2	CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE FAGOS .....	104
3.2.7.3	AMPLIFICACIÓN Y TITULACIÓN DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN.....	106
3.2.7.4	AI SLAMIENTO DE FAGOS AL AZAR.....	106
3.2.7.5	DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL INSERTO EN LOS FAGOS RECOMBINANTES MEDIANTE PCR.....	106
3.2.7.6	ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	107
3.2.7.7	CONVERSIÓN DEL FAGO $\lambda$ TRIPLEX2 A PLÁSMIDO pTRIPLEX2.....	107
3.2.7.8	PCR DE LOS CLONES RECOMBINANTES.....	108
3.2.7.9	AI SLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO.....	108
3.2.7.10	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	109
3.2.7.11	SECUENCIACIÓN DE ADN .....	109

3.2.7.12	AMPLIFICACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN LAS PROTEÍNAS SALIVALES .....	111
3.2.7.12.1	AMPLIFICACIÓN DE GENES DE INTERÉS A PARTIR DE ADN PLASMÍDICO P <sub>TRIPLE</sub> EX2 RECOMBINANTE .....	112
3.2.7.12.2	AMPLIFICACIÓN DE OTROS GENES DE INTERÉS A PARTIR DE LA GENOTECA.....	113
3.2.7.12.3	PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA .....	113
3.2.7.13	SUBCLONACIÓN DE ADNc EN VECTORES .....	113
3.2.7.13.1	SUBCLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICACIÓN EN EL VECTOR PCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> .....	113
3.2.7.13.2	SUBCLONACIÓN EN VECTORES DE EXPRESIÓN PROCARIOTA .....	114
3.2.7.14	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	117
3.2.8	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> .....	118
3.2.8.1	EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	118
3.2.8.2	PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	119
3.2.8.2.1	CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD .....	119
3.2.8.2.2	ESCISIÓN DE BANDAS PROTEICAS DE GELES DE POLIACRILAMIDA .....	120
3.2.8.3	ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	120
3.2.8.3.1	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	120
3.2.8.3.2	TINCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	120
3.2.8.3.3	DETECCIÓN DE RESIDUOS DE HISTIDINA MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i> .....	120
3.2.8.3.4	RENATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS .....	121
3.2.8.3.5	CONCENTRACIÓN DE MUESTRAS PROTEICAS .....	121
3.2.9	EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA SALIVA COMO MARCADORES DE LA EXPOSICIÓN A LA PICADURA DE LOS FLEBOTOMOS .....	121
3.2.9.1	SUEROS .....	122
3.2.9.2	EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES MEDIANTE ELISA.....	122
3.2.9.3	EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i> .....	123
3.2.10	OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA IN HOUSE PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTISALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> EN SUEROS DE ANIMALES .....	124
3.2.11	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgG ANTISALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> EN EL SUERO DE POTENCIALES RESERVORIOS EN EL CONTEXTO DEL BROTE DE LEISHMANIOSIS HUMANA DE LA COMUNIDAD DE MADRID. ....	125
3.2.12	ESTUDIO DE LAS REACCIONES CRUZADAS ENTRE ANTICUERPOS SALIVALES PRESENTES EN EL SUERO DE CRICETOS Y RATONES INMUNIZADOS EXPERIMENTALMENTE CON SALIVA DE DIFERENTES ESPECIES DE FLEBOTOMOS .....	127
3.2.13	ESTADÍSTICA .....	127
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>131</b>
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> . ....	131
4.1.1	ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFIL PROTEICO DE LA SALIVA DE TRES COLONIAS DE <i>P. PERNICIOSUS</i> Y UNA COLONIA DE <i>P. ARGENTIPES</i> .....	131
4.1.2	ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO DE LA SALIVA EN RELACIÓN CON LA EDAD DE LOS FLEBOTOMOS. ....	132
4.1.3	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL .....	132
4.2	INMUNIZACIÓN DE RATONES Y CRICETOS CON LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> A TRAVÉS DE LA PICADURA .....	143
4.3	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS EN LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> .....	147
4.4	CINÉTICA DE ANTICUERPOS IgG ANTISALIVA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	149
4.4.1	CINÉTICA DE ANTICUERPOS ANTISALIVA EN RATONES BALB/c .....	149
4.4.2	CINÉTICA DE ANTICUERPOS ANTISALIVA EN CONEJOS .....	152
4.5	ENSAYOS DE REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE ANTICUERPOS FRENTE A LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> Y OTRAS ESPECIES DE FLEBOTOMOS.....	157
4.5.1	REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE ANTICUERPOS FRENTE A LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> Y <i>P. ARGENTIPES</i> .....	157

4.5.2	REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE ANTICUERPOS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> , <i>P. SERGENTI</i> , <i>P. PAPATASI</i> Y <i>L. LONGIPALPIS</i> .	158
4.6	ANÁLISIS DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN OBTENIDA A PARTIR DE GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> .	159
4.7	OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	173
4.7.1	CLONACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN LAS PROTEÍNAS DE LA SALIVA SP01, SP01B, SP03B, SP04, SP04B Y SP08.	173
4.7.2	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> .	176
4.8	EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES COMO MARCADORES DE EXPOSICIÓN A LAS PICADURAS DE <i>P. PERNICIOSUS</i>	181
4.9	ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE ANTICUERPOS IgG PRESENTES EN SUEROS DE RATONES BALB/C FRENTE A LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RSP01B Y RSP04.	188
4.10	ESTUDIO DE LA EXPOSICIÓN DE RESERVORIOS A LAS PICADURAS DE <i>P. PERNICIOSUS</i> EN EL CONTEXTO DEL BROTE DE LEISHMANIOSIS DEL SUROESTE DE LA CM	193
4.10.1	ESTUDIO DE SUEROS DE ANIMALES SILVESTRES	193
4.10.1.1	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG FRENTE A LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> PRESENTES EN LOS SUEROS DE ANIMALES SILVESTRES	193
4.10.1.2	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG FRENTE A LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RSP03B Y RSP01B DE <i>P. PERNICIOSUS</i> PRESENTES EN LOS SUEROS DE ANIMALES SILVESTRES	195
4.10.2	ESTUDIO DE SUEROS DE PERROS	198
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>203</b>
5.1	DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN PROTEICO DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> .	203
5.2	INMUNIZACIÓN DE ANIMALES CON LA SALIVA A TRAVÉS DE LAS PICADURAS DE <i>P. PERNICIOSUS</i> Y CINÉTICA DE ANTICUERPOS ANTISALIVA	207
5.3	IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS SALIVALES	210
5.4	ANÁLISIS DE LA GENOTECA DE ADNc DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> .	213
5.5	OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA SALIVA Y SU EVALUACIÓN COMO MARCADORES DE EXPOSICIÓN	216
5.6	ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTISALIVA	219
5.7	ESTUDIO DE LA EXPOSICIÓN NATURAL DE RESERVORIOS A LAS PICADURAS DE <i>P. PERNICIOSUS</i> EN EL CONTEXTO DEL BROTE DE LEISHMANIOSIS DEL SUROESTE DE LA COMUNIDAD DE MADRID.	221
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>229</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>233</b>
<b>8</b>	<b>APÉNDICE</b>	<b>267</b>
8.1	LISTA DE FIGURAS	267
8.2	LISTA DE TABLAS	275
8.3	PUBLICACIONES	277

## SUMMARY

Leishmaniasis is a parasitic disease, where the parasite- *Leishmania* spp.- is the causative agent while several species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) serve as vectors. Sand fly saliva is actively involved in the transmission as it contains a complex cocktail of antihemostatic and immunomodulatory molecules that are inoculated into host skin during blood feeding. Concretely, sand fly salivary proteins are on the spotlight to become vaccine candidates against leishmaniasis as well as markers of exposure to sand fly bites due to the host immune responses they elicit.

The aim of this thesis is to expand the knowledge of the salivary proteins of *Phlebotomus perniciosus*, the most widespread vector of *Leishmania infantum* to humans and dogs in the western Mediterranean Basin. Sand fly salivary proteomic maps were established by two dimensional electrophoresis (2DE) for the first time. Protein spots observed in the gels matched the protein bands found in the monodimensional profile and were identified as salivary proteins confirming this technology as an interesting tool to improve arthropod saliva knowledge. The *P. perniciosus* salivary proteomic map consist of at least 25 spots which were mostly distributed between 25 and 50 kDa and around 15 kDa according to molecular weight. Additionally, the pattern showed two protein clusters regarding their pI. Interestingly, proteomic studies highlighted the presence of isoforms or post-translational modifications in the salivary proteins of *P. perniciosus*.

Hyperimmune sera were obtained from mice, hamsters and rabbits previously and experimentally immunized through the bite of uninfected sand flies. The anti-saliva antibody levels depended on the exposure schedule and correlated with the number of sand fly bites. Moreover, anti-saliva antibodies can be detected in sera of mice and rabbits from the fourth and second week after exposure and can persist at least twelve and seventeen weeks respectively after the last exposure to *P. perniciosus* bites. Studies on salivary antibody kinetics provided useful information for an accurate application of anti-saliva antibodies as markers of exposure in the field.

Mouse, hamster and rabbit sera used in Western blot revealed different immunogenic salivary proteins stressing the specificity of salivary proteins in immune responses of vertebrates. Yellow proteins, apyrases, D7-related proteins and PpSP15-like proteins were identified by combining 2DE methodology, mass spectrometry and Western blotting as the main salivary antigens of *P. perniciosus*.



A cDNA library from the salivary glands of *P. perniciosus* from Madrid, reared in the laboratory, was successfully constructed. High level of conservancy was found between salivary transcripts of *P. perniciosus* from Spain and Italy. In addition, at the proteomic level, *P. perniciosus* of three distinct geographical origins in Spain share the same salivary protein profile. Thus, little antigenic variation is expected among *P. perniciosus* populations suggesting that recombinant salivary proteins could be used in different geographic areas where this sand fly species is present.

Working with the whole salivary homogenate entails serious drawbacks such as the need for maintaining sand fly colonies and the laborious task of glands dissection. Therefore, three recombinant salivary proteins (rSP01B, rSP04 and rSP08) using the cDNA library as a starting material were cloned, expressed and purified.

The three recombinant salivary proteins were evaluated as markers of exposure to *P. perniciosus* bites. The D7-related protein, rSP04, was not recognized by any sera of exposed mice or dogs and the ParSP25-like protein, rSP08, showed good results with mice but not with canine sera. However, the recombinant salivary apyrase, rSP01B, proved adequate as marker of exposure to *P. perniciosus* in mice, hares and rabbits, but not in dogs, emphasizing the variability on the immune responses in several vertebrates.

Specificity of anti-saliva antibodies was confirmed among sera of mice exposed to *P. perniciosus*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti*, *Phlebotomus argentipes* and *Lutzomyia longipalpis* confirming the use of saliva as a specific epidemiological tool. In addition, recombinant salivary apyrase rSP01B showed adequate specificity features but not the recombinant rSP08.

An ELISA in house technique was developed to detect anti-sand fly saliva antibodies present in sera of vertebrate reservoirs in order to determine the level of exposure of animals to sand fly bites.

Exposure of hares and wild rabbits to *P. perniciosus* bites was confirmed with this ELISA test in the context of an outbreak of human leishmaniasis in the south-west region of Madrid, supporting the involvement of wild leporids as *Leishmania* reservoirs. This is the first report of anti-saliva antibody levels in naturally bitten domestic dogs and wild animals in Spain and can be considered as a valuable starting point for future studies on the efficacy of anti-vector control measures.

# THESIS SUMMARY FOR EUROPEAN DOCTORATE MENTION

## 1. Introduction

Leishmaniasis is still one of the most important vector borne diseases in terms of incidence as two million people per year are affected worldwide. The causative agent of the aforementioned disease is *Leishmania* spp., a flagellate parasite which is transmitted by infected phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) during blood feeding. These bloodsucking insects need to acquire vertebrate blood to promote egg development. During blood feeding, saliva is injected at the site of the bite. Insect saliva facilitates blood meal acquisition through pharmacologically active compounds that prevent host haemostatic and immune responses. Consequently, arthropod saliva has evolved in such a way to support blood feeding success.

Vector borne pathogens take advantage of the salivary properties of their vectors in order to enhance their transmission. During an infective bite, sand fly saliva is injected along with *Leishmania* spp. metacyclic promastigotes and it is known to play an important role in host infection establishment. Sand fly saliva particularly enhances transmission of *Leishmania* spp. These enhancing effects on leishmaniasis onset are linked to its ability to modulate both the innate and acquired immune responses. On the other hand, pre-exposure to non-infected sand fly bites or immunization against either salivary gland homogenate (SGH) or specific salivary proteins results in humoral and/or cellular responses that lead to protection against the establishment of infection. In the last years, research on sand fly salivary proteins has greatly increased suggesting that salivary proteins could be successfully assayed as anti-*Leishmania* vaccine candidates.

Anti-saliva antibody response can be used as marker of exposure to sand flies. As hosts are bitten they develop humoral responses against sand fly saliva. Moreover, a positive correlation has been observed between number of bites and antibody levels. Therefore, host exposure to sand flies can be measured by evaluating humoral responses against salivary antigens. This methodology is being applied mainly using salivary gland extracts but recombinant salivary proteins have been already produced for sand fly species such as *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. Some of these proteins have been already proved as good markers of exposure. However, since salivary proteins display high specificity, it is necessary to produce immunogenic salivary proteins for other sand fly species.

Human leishmaniasis is a hypoendemic disease in Spain, where the parasite-*Leishmania infantum*- acts as the causative agent while two species of phlebotomine sand flies belonging to the genus *Phlebotomus* serve as vectors (*Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi*). It is considered a zoonotic disease, the dog being the main reservoir. From July 2009 to date, a leishmaniasis outbreak has occurred in the south-west of the Madrid region and has already accounted for more than 450 human cases in an area that comprises a population of approximately 500.000. The main vector in the area is *P. perniciosus*. Although canine leishmaniasis prevalence in the focus is not higher than the average in the Madrid region, a wild reservoir – the hare - has been implicated.

## 2. Objectives

The main objective of this Thesis was to study the protein content of the saliva of *P. perniciosus* for a better understanding of the immunogenic properties of salivary proteins and to evaluate its potential application in the eco-epidemiology and control of leishmaniasis in the Mediterranean Basin.

Therefore, in order to address this purpose, the following objectives were established:

1. Characterization of the protein content of the saliva of *P. perniciosus* by two-dimensional electrophoresis.
2. Immunization of laboratory animals with salivary proteins through the bite of uninfected sandflies and study of specificity and kinetics of anti-saliva antibodies.
3. Identification of salivary antigenic proteins of *P. perniciosus*.
4. Construction of an expression library from salivary glands of *P. perniciosus* and producing recombinant salivary proteins.
5. Standardization of an ELISA in house technique to assess the level of exposure of different vertebrates to the bite of *P. perniciosus*
6. Evaluation of the recombinant salivary proteins as markers of exposure to the bite of *P. perniciosus*.
7. Study of the exposure of domestic and wild reservoirs to *P. perniciosus* bites in the context of an outbreak of leishmaniasis in the Madrid region.

## 3. Results

**Salivary proteins of *P. perniciosus* were analyzed by bidimensional electrophoresis.** The protein spots observed in the 2DE gels matched the protein bands

found in the 1DE profile. This pattern consisted of at least 25 spots which were mostly distributed between 25 and 50 kDa, and around 15 kDa regarding molecular weight and the pattern showed two protein clusters according to their pI. Most of the protein spots appeared around pH 9, while the other set of proteins were found between pH 4 and 6. The 2DE-MS/MS approach used in this study revealed that several proteins occurred in multiple spots in the proteome, suggesting either post-translational modifications or protein isoforms presence.

For the *P. perniciosus* colony from Madrid salivary gland contents gradually increased with the age of the sand flies. Concretely, the complete profile was reached at day four. Moreover, analysis of the salivary gland contents of three *P. perniciosus* colonies from different geographic origins in Spain led to a similar protein profile.

**Mice and hamsters were immunized** with salivary proteins through the bite of uninfected sand flies. Animals developed a specific immune response against salivary proteins and hyperimmune sera was used to **detect salivary antigens by Western blot**. There were several differences in the intensity of the reactions by the different vertebrate antibodies. Hamster sera strongly recognized several spots of the yellow protein SP03 whereas mice sera faintly reacted with two spots of the SP03 series. Both mouse and hamster sera yielded a high recognition to the ParSP25-like protein SP08. However, apyrases were mostly recognized by mouse sera rather than hamster sera. On the other hand, D7-related proteins were only highlighted as antigens by hamster sera.

In addition, **antisaliva antibody kinetics** were studied with sera of mice and rabbits immunized through the bite of uninfected sand flies. In both cases anti-saliva antibody levels increased along the immunizations and correlated with the number of sand fly bites. After the last exposure, antibody levels persisted in the sera of mice and rabbits at least for 3 and 5 months, respectively.

**A cDNA library was successfully constructed** with salivary glands of *P. perniciosus* from Madrid (Spain) and showed a titer of  $3.6 \times 10^6$  and 17.6% of not recombinant clones. The amplified library displayed a larger number of independent clones ( $1.2 \times 10^{12}$ ) and a low number of non-recombinant clones (1.92%). Therefore, this amplified library was used for subsequent analysis and cloning processes. 36 out of 201 analyzed plaques were selected, converted into pTriplEx2 and further sequenced. Among the 25 complete transcripts, they were identified mostly as apyrases (SP01, SP01B), D7-related proteins (SP04, SP04B), yellow proteins (SP03B), ParSP25-like proteins (SP08), lufaxin-like proteins (SP06) and PpSP15-like proteins (SP02, SP09, SP11). Complete sequences were

annotated at EMBL nucleotide database. Overall, high degree of conservancy was found among the salivary transcripts we sequenced and their best matches available in non-redundant databases which were obtained from a cDNA library from *P. perniciosus* from Italy. However, analysis of the cDNA sequences showed several polymorphisms among the previously described salivary transcripts.

Using the cDNA library as a starting material several **recombinant proteins** were successfully cloned and expressed in *Escherichia coli* strains. The apyrase SP01B, the D7-related protein SP04 and the ParSP25-like protein SP08 were purified in denaturing conditions and produced as recombinant proteins and they were refolded to their native form. These three proteins were tested as markers of exposure to *P. perniciosus* bites with sera of mice and dogs experimentally exposed to sand fly bites. rSP04 was not recognized by any sera of the immunized animals. In contrast rSP01B and rSP08 were recognized by sera of both mice and dogs by Western blot. In ELISA, only mice antibody levels against rSP01B and rSP08 correlated with mice antibodies against the total salivary extract. Canine antibodies against these recombinants did not correlate with canine antibodies against salivary extract. This data highlights a discrepancy between the recognition of these recombinant proteins by canine sera in Western blot and ELISA.

**Absence of cross-reactivity** between *P. perniciosus*, *Phlebotomus argentipes*, *P. papatasi*, *Phlebotomus sergenti* and *L. longipalpis* saliva antibodies was highlighted, as sera of immunized hamsters or mice exposed to the bites of a sand fly species selectively recognized the salivary proteins of this vector and not the related proteins from the others sandflies. In the case of the recombinant proteins, the apyrase rSP01B was specifically recognized by sera of mice immunized with *P. perniciosus* salivary proteins and not by sera of mice exposed to *P. papatasi*, *P. sergenti* and *L. longipalpis*. However, rSP08 was not only recognized by sera of mice exposed to *P. perniciosus* but also by sera of mice exposed to *P. sergenti*, exhibiting certain degree of cross-reactivity.

**Anti-saliva antibody levels were measured in sera of wild and domestic animals from the re-emerging leishmaniasis focus in Madrid**, to test their exposure to the bites of *P. perniciosus*. Hares collected in a green park adjacent to the focus (n=59) showed positive exposure to *P. perniciosus* bites in comparison to hares from a non-endemic area (Czech Republic, n=18). ELISA of all hare sera from the focus displayed significantly higher IgG anti-saliva antibody levels than negative controls from the non-endemic area ( $p < 0.0001$ ). All values were greater than the cut off set at  $OD_{492} = 0.17$ , ranging from low ( $OD_{492} = 0.42$ ) to very high positives ( $OD_{492} = 3.95$ ). A significant positive correlation was found between IgG response to the apyrase rSP01B and salivary gland homogenate ( $r = 0.710$ ). Wild rabbits

captured in the study area (n=21) presented higher anti-saliva antibody levels than negative control sera ( $p<0.0001$ ). The absorbance values varied more than in hares. However, the maximum antibody levels were lower. No difference was found between anti-saliva antibody values from rabbits captured in 2011/2012 versus 2013 ( $p=0.59$ ). Wild rabbits IgG response against recombinant salivary proteins were positively correlated with salivary gland homogenate (rSP01B:  $r=0.666$ ). Sera of both wild hares and rabbits recognized several *P. perniciosus* salivary proteins as demonstrated by the Western blot. Sera of hares mostly recognized the 48, 44, 31 and 27 kDa protein bands while the most antigenic ones for wild rabbits appeared at 48, 44, 37, 31 and 29 kDa. Apart from these five protein bands, the serum of a experimentally exposed rabbit recognized additional bands at 41, 35, 33 and 24 kDa.

Sera from dogs in the leishmaniasis focus area (n=34) showed significantly higher anti-saliva antibody levels than the non-exposed dogs (cut off=0.24,  $p<0.0001$ ). Additionally, dogs partially protected against sand fly bites through both the use of topical insecticides and by sleeping indoors showed significantly lower antibody levels than the non-protected ones ( $p=0.021$ ).

#### **4. Conclusions**

1. *Phlebotomus perniciosus* salivary proteomic maps were established by two dimensional electrophoresis for the first time. Protein spots observed in the gels matched the protein bands found in the monodimensional profile and were identified as salivary proteins confirming this technology as an interesting tool to improve arthropod saliva knowledge. In addition, proteomic studies highlighted the presence of isoforms or post-translational modifications in the salivary proteins of *P. perniciosus*.

2. Hyperimmune sera were obtained from animals experimentally immunized through the bite of uninfected sand flies. The anti-saliva antibody levels depended on the exposure schedule and correlated with the number of sand fly bites. Moreover, anti-saliva antibodies can be detected in sera of mice and rabbits from the fourth and second week after exposure, respectively, and can persist at least twelve and seventeen weeks after the last exposure to *Phlebotomus perniciosus* bites, respectively. Studies on salivary antibody kinetics provide useful information for an accurate application of anti-saliva antibodies as markers of exposure in the field.

3. Mouse, hamster and rabbit sera used in Western blot revealed different immunogenic salivary proteins stressing the specificity of salivary proteins in immune responses of vertebrates.

4. A cDNA library from the salivary glands of *P. perniciosus* from Madrid was successfully constructed. High level of conservancy was found between salivary transcripts of *P. perniciosus* from Spain and Italy. In addition, at the protein level, *P. perniciosus* of 3 distinct geographical origins in Spain share salivary protein profile. Thus, little antigenic variation is expected among *P. perniciosus* populations suggesting that recombinant salivary proteins could be used in different geographic areas where this sand fly species is present.

5. In order to determine the level of exposure of animals to sand fly bites an ELISA technique was developed to detect anti-sand fly saliva antibodies present in sera of vertebrate reservoirs. By using this ELISA test, the recombinant salivary apyrase rSP01B proved to be adequate as marker of exposure to *P. perniciosus* in mice, hares and rabbits, but not in dogs, emphasizing different immunogenicity for the immune responses in several vertebrates. On the other hand, the recombinant D7 protein rSP04 was not suitable as marker of exposure to *P. perniciosus* bites.

6. Specificity of anti-saliva antibodies was confirmed among sera of mice exposed to *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. argentipes* and *L. longipalpis* confirming the use of saliva as a specific epidemiological tool. In addition, recombinant salivary apyrase rSP01B showed appropriate specificity features but not the recombinant rSP08 or rSP04. Therefore, more research on sand fly saliva specificity is needed.

7. Our results confirmed the exposure of hares and rabbits to *P. perniciosus* bites in the context of the outbreak of human leishmaniasis in Madrid, supporting the involvement of wild leporids as *Leishmania* reservoirs. This is the first report of anti-saliva antibody levels in naturally bitten domestic dogs and wild animals in Spain and can be considered as a valuable starting point for future studies on the efficacy of anti-vectorial control measures.







# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Aspectos generales de la leishmaniosis

La leishmaniosis engloba un conjunto de enfermedades causadas por al menos 20 especies de protozoos pertenecientes al género *Leishmania* (Figura 1), constituyendo un importante problema de salud pública en Latinoamérica, sur de Europa, África y Asia. Según la OMS, esta enfermedad se considera una de las parasitosis más importantes por su amplia distribución, incidencia y dificultad de control. Los datos de prevalencia indican que hay 12 millones de enfermos y la incidencia asciende a dos millones de casos nuevos anuales. De estos, 1'5 millones corresponden a formas cutáneas y 0'5 a viscerales, siendo la población en riesgo de aproximadamente 350 millones de personas (Murray y col., 2005; OMS, 2010). Sin embargo, los datos oficiales disponibles no son realistas ya que numerosos casos no son diagnosticados y la declaración de estos sólo es obligatoria en 40 de los 88 países endémicos (Alvar y col., 2012).

La leishmaniosis es una enfermedad de transmisión vectorial, ya que el parásito requiere de un díptero (flebotomo) para completar su ciclo biológico y es transmitido por su picadura.

Dependiendo de la especie de *Leishmania* y de la respuesta inmune desarrollada por el hospedador, la leishmaniosis comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas que cursan bien con afectaciones cutáneas autolimitantes o con formas viscerales, en su mayoría fatales sin tratamiento, existiendo un amplio abanico de posibilidades clínicas.

**La leishmaniosis visceral (LV)** está causada por parásitos del complejo *Leishmania donovani-Leishmania infantum* y se diferencia según su distribución y carácter zoonótico o antroponótico. La sintomatología de la LV comienza tras un periodo de incubación que puede oscilar entre 10 días y más de un año, con la aparición de fiebre, malestar, escalofríos, pérdida de peso, anorexia y afectación de los órganos internos (esplenomegalia y hepatomegalia), (Figura 2E). La LV zoonótica se distribuye por el sur de Europa y Latinoamérica, siendo el perro el principal reservorio, mientras que la LV antroponótica azota fuertemente algunas regiones de Asia y África Oriental (OMS, 2010).

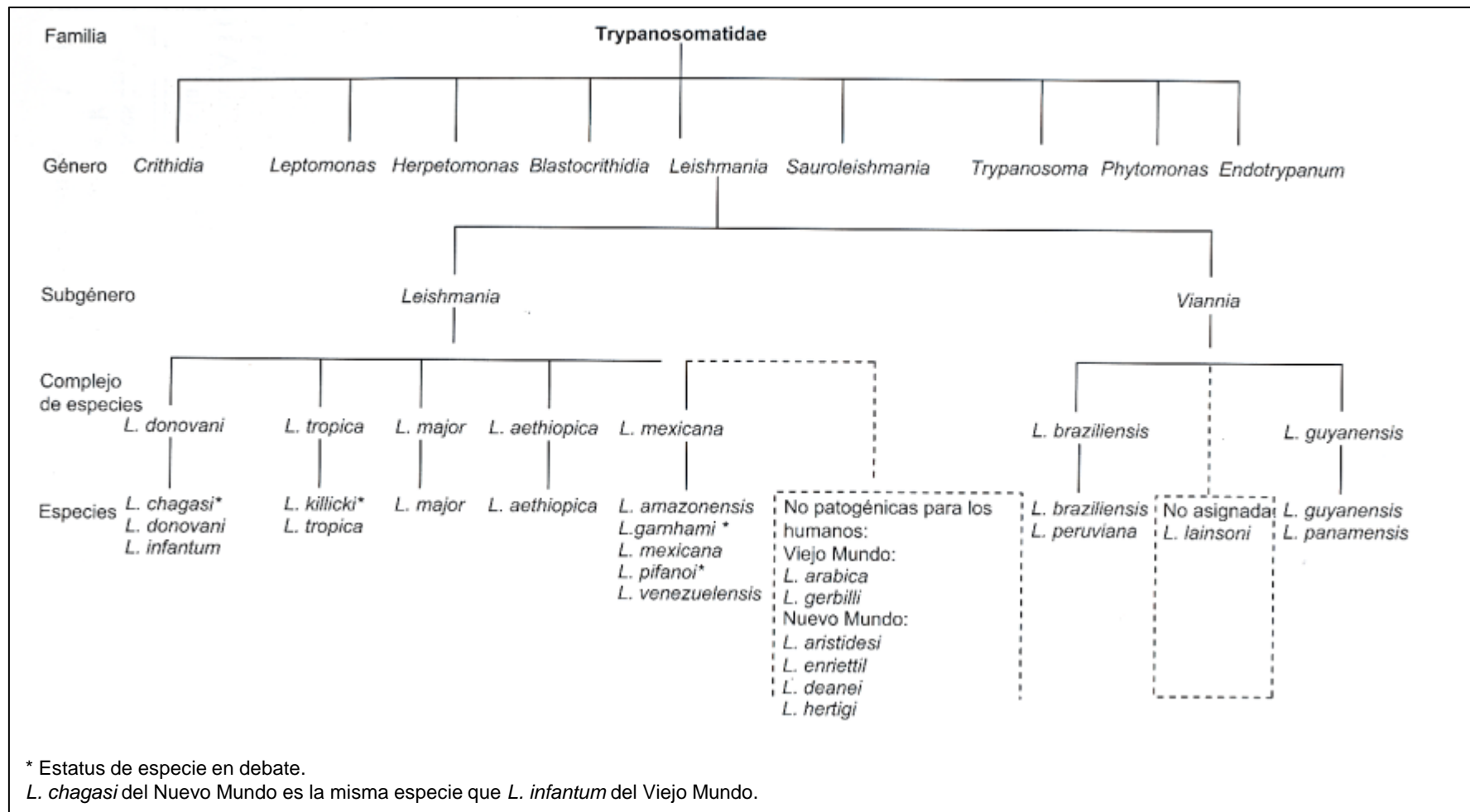
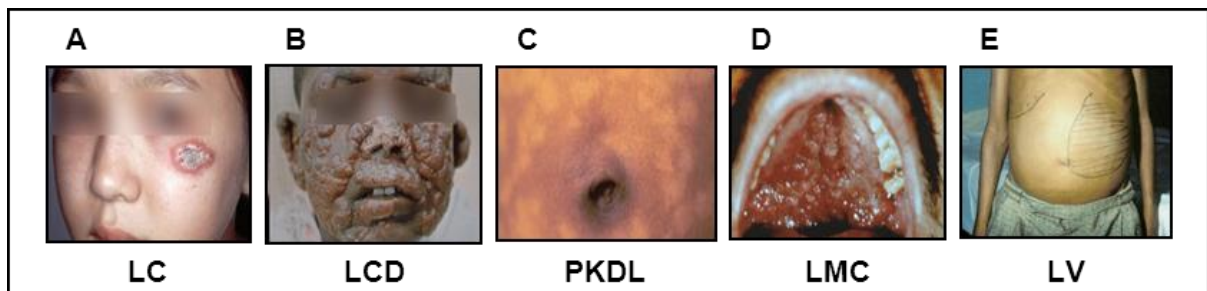


Figura 1. Los parásitos causantes de la leishmaniosis. Fuente: Modificado de OMS (2010).

**La leishmaniosis cutánea (LC) en el Viejo Mundo** está causada por *L. infantum*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* y *L. donovani*. Las lesiones cutáneas son altamente variables, pudiendo presentarse como una lesión que comienza en el punto de inoculación, en forma de pápula o nódulo, como en el caso de la LC de carácter zoonótico causada por *L. infantum* (Figura 2A), o como una úlcera seca e indolora, frecuentemente múltiple, como las provocadas por *L. tropica*, dando lugar a la LC de carácter antroponótico. La LC zoonótica causada por *L. major* produce lesiones ulceradas e inflamadas mientras que *L. aethiopica* puede causar LC con aparición de nódulos localizados o LC difusa (LCD), caracterizada por la abundancia de máculas, pápulas, nódulos o placas cutáneas muy diseminadas en ausencia de úlceras, en la que la afectación de la mucosa está confinada a los bordes de los orificios nasales y labios (Figura 2B). La leishmaniosis dérmica poskala-azar (PKDL) ocurre en todas las zonas donde *L. donovani* es endémica, aunque es más frecuente en África Oriental y en el subcontinente indio (Figura 2C). **La LC en el Nuevo Mundo** puede estar originada por multitud de especies encuadradas en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Figura 1). La LCD en estas regiones está producida por *Leishmania mexicana* y *Leishmania amazonensis* y es similar a la del Viejo Mundo, desde el punto de vista clínico y patológico. La leishmaniosis mucocutánea (LMC), originada principalmente por especies del subgénero *Viannia* (*Leishmania braziliensis* y *Leishmania panamensis*), cursa con afectación de las mucosas nasal y orofaríngea (Figura 2D).



**Figura 2. Manifestaciones clínicas de la leishmaniosis.** A) Leishmaniosis cutánea. B) Leishmaniosis cutánea difusa. C) Leishmaniosis dérmica poskala-azar. D) Leishmaniosis muco-cutánea. E) Leishmaniosis visceral. Fuente: Fotografías A-D tomadas de *The Wellcome Trust* (2000). Fotografía E tomada de Murray y col. (2005).

## 1.2 La leishmaniosis en la cuenca mediterránea

### 1.2.1 Agente causal

*L. infantum* es la especie responsable de la LV en Europa, aunque recientemente se ha constatado la introducción de *L. donovani* en Chipre (Mazeris y col., 2010; OMS, 2010). *L. infantum* es también la causante de la LC en Europa, responsabilidad compartida con *L. tropica*, en sus regiones más orientales, como Turquía y Grecia, y en el norte de África. *L. major* también está presente en el norte de África (OMS, 2010; Antoniou y col., 2013).

Morfológicamente, *L. infantum* es un protozoo flagelado caracterizado por poseer kinetoplasto (Clase: Kinetoplastea), estructura rica en ADN localizada en el interior de la única mitocondria situada detrás del bolsillo flagelar. Pertenece a la familia Trypanosomatidae, ya que está provista de flagelo, género *Leishmania* y subgénero *Leishmania* debido a que la multiplicación del parásito en el tubo digestivo del vector se realiza en la región suprapilórica de su intestino medio (Tabla 1).

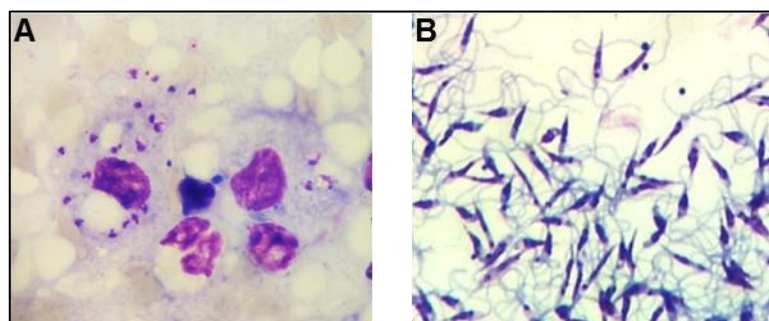
**Tabla 1. Posición taxonómica de *Leishmania infantum* (Cavalier-Smith, 1998).**

<b>Reino</b>	Protozoa
<b>Filo</b>	Euglenozoa
<b>Subfilo</b>	Saccostoma
<b>Clase</b>	Kinetoplastea
<b>Orden</b>	Trypanosomatida
<b>Familia</b>	Trypanosomatidae
<b>Género</b>	<i>Leishmania</i>
<b>Subgénero</b>	<i>Leishmania</i>
<b>Especie</b>	<i>infantum</i>

*L. infantum* es un parásito que, para completar su ciclo biológico, requiere la presencia de un mamífero como hospedador vertebrado y un artrópodo vector como hospedador invertebrado, como se mencionó anteriormente.

El parásito alterna una forma intracelular e inmóvil denominada amastigote, presente en el hospedador vertebrado, con una forma extracelular y móvil que recibe el nombre de promastigote, presente en el tubo digestivo del vector. Los amastigotes son redondeados y su tamaño oscila entre 2 y 4  $\mu\text{m}$ , mientras que los promastigotes son alargados, con un

cuerpo de 10  $\mu\text{m}$  y un flagelo de 15  $\mu\text{m}$  de longitud, que le proporciona movilidad. Estas diferencias morfológicas se muestran en la Figura 3.



**Figura 3. Morfología de *Leishmania infantum*. A) Amastigotes en un macrófago del hígado de un criceto infectado experimentalmente con *L. infantum*. B) Promastigotes procedentes del tubo digestivo de un flebotomo infectado con *L. infantum* en el laboratorio. Ambas preparaciones están teñidas con Giemsa. Fuente: Unidad de Entomología Médica (ISCIII).**

### 1.2.2 Ciclo biológico

El ciclo se inicia cuando un flebotomo infectado inocula los promastigotes, junto con su saliva a un vertebrado, durante la ingesta de sangre. El promastigote penetra en las células del sistema fagocitario mononuclear, directamente o englobado en neutrófilos polimorfonucleares (Laskay y col., 2003). El parásito se transforma en amastigote y se multiplica intracelularmente. Cuando el macrófago no puede albergar más amastigotes, se rompe y los parásitos libres invaden nuevas células monocíticas. La infección puede quedar localizada en los macrófagos de la dermis, dando lugar a la forma cutánea de la enfermedad, o diseminarse hacia la médula ósea, el hígado y el bazo, originando una leishmaniosis visceral. Cuando una hembra de un flebotomo ingurgita sangre con macrófagos parasitados, estos son lisados por las enzimas presentes en el tubo digestivo del insecto y los amastigotes liberados se transforman en promastigotes. Estos se multiplican y sufren diversas transformaciones en su avance hacia la zona anterior del tubo digestivo, convirtiéndose finalmente en promastigotes metacíclicos, forma infectiva para el hospedador vertebrado (Figura 4). Información ampliada acerca del ciclo intravectorial de *Leishmania* se recoge en el Apartado 1.3.4.3.

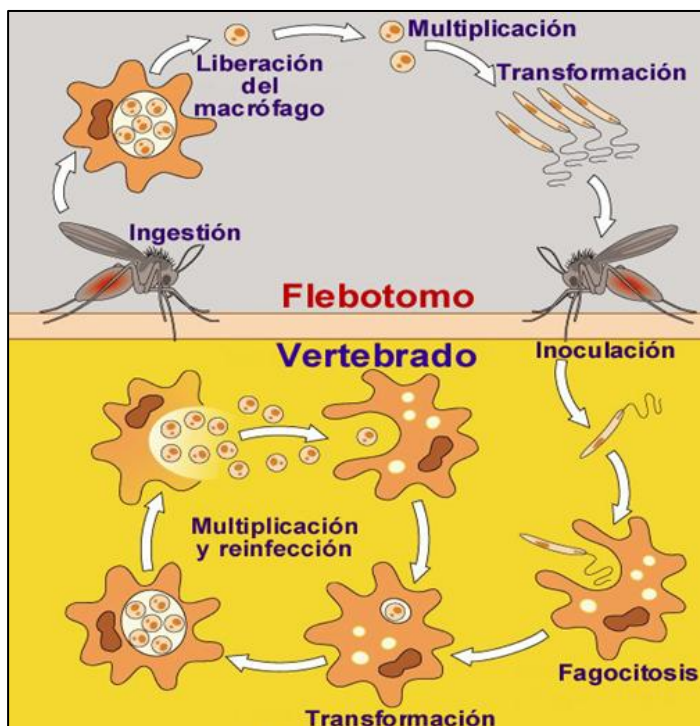


Figura 4. Ciclo biológico de *Leishmania infantum*. Fuente: Imagen modificada de *The Wellcome Trust* (2000).

### 1.2.3 Vectores implicados en la transmisión de *L. infantum*

Los vectores implicados en la transmisión de la leishmaniosis en la cuenca mediterránea pertenecen al subgénero *Larroussius*. Concretamente, de las 10 especies de *Phlebotomus* presentes en España -*Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus langeroni*, *Phlebotomus sergenti*, *Phlebotomus mascitti*, *Phlebotomus longicuspis*, *Phlebotomus fortunatarum*, *Phlebotomus alexandri* y *Phlebotomus chabaudi*- únicamente las dos primeras están implicadas en la transmisión de *L. infantum* (Gil-Collado y col., 1989; Conesa-Gállego y col., 1999).

*P. perniciosus* está ampliamente distribuido en la geografía española, actuando por tanto como el principal vector de la leishmaniosis. Esta especie, fue descrita por primera vez en 1911 por Newstead a partir de ejemplares capturados en Malta (Newstead, 1911). En cambio, *P. ariasi* ha sido descrito de forma puntual como responsable de la transmisión de la leishmaniosis en algunos focos de Cataluña, Aragón y Castilla y León (Miró y Molina, 2006).

La tasa de infección de los flebotomos por *L. infantum* en España, obtenida mediante disecciones y aislamiento posterior del parásito, oscila entre un 0´4% y un 4´6% en especímenes capturados en Tarragona, Almería, Zaragoza, Madrid, Mallorca, Ibiza y

Formentera (Rioux, 1986; Morillas-Márquez y col., 1991; Morillas y col., 1996; Miró y Molina, 2006). Si se determina la presencia de *L. infantum* en los flebotomos, mediante herramientas moleculares, estos valores pueden verse sensiblemente incrementados (38´7-58´5%), tal y como han descrito diversos autores en el estudio de focos activos de leishmaniosis (Alcover y col., 2012; Jiménez y col., 2013).

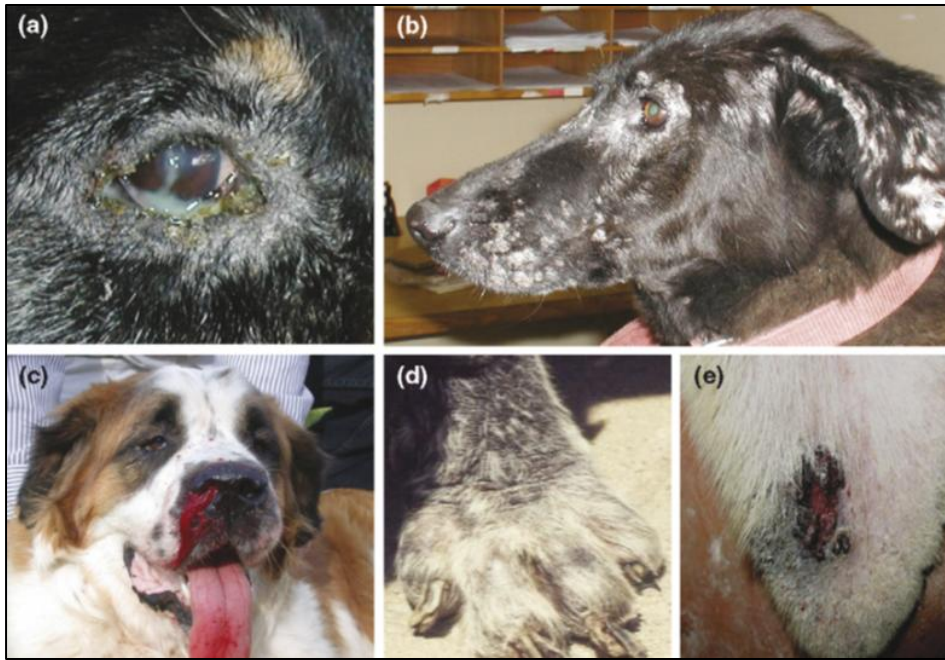
#### **1.2.4 Reservorios de *L. infantum***

##### **1.2.4.1 El perro**

El principal reservorio de *L. infantum* es el perro que juega un papel esencial en el ciclo de transmisión doméstica de la leishmaniosis zoonótica (Moreno y Alvar, 2002; Barbieri, 2006). La leishmaniosis canina (LCan) cursa con afectación cutánea y visceral (Baneth y col., 2008).

La LCan es una enfermedad multisistémica con signos clínicos altamente variables debido a la multiplicidad de los mecanismos patogénicos y a las diferencias individuales en la respuesta inmune desarrollada por cada perro. Los cuadros clínicos se pueden dividir en dos grandes grupos: las lesiones cutáneas y los trastornos debidos a la visceralización (Figura 5). Las lesiones cutáneas pueden ser localizadas, coincidentes con el lugar de la picadura (chancro de inoculación) o generalizadas, derivadas de la diseminación orgánica del parásito. Los trastornos debidos a la visceralización engloban síntomas inespecíficos, entre los que se encuentran el adelgazamiento, astenia, inapetencia, atrofia muscular, anemia no regenerativa y linfadenomegalia. Los síntomas específicos incluyen las alteraciones renales, causa de muerte más frecuente en los perros con leishmaniosis, alteraciones hepáticas, digestivas, oculares, poliartritis y hemorragias (Alvar y col., 2004; Miró y Molina, 2006; Baneth y col., 2008).





**Figura 5. Leishmaniosis canina. A) Queratoconjuntivitis purulenta con dermatitis periocular. B) Lesiones dérmicas faciales con dermatitis exfoliativa. C) Epistaxis. D) Onicogriposis. E) Úlcera dérmica en la oreja. Fuente: Baneth y col. (2008).**

La evolución de la infección por *L. infantum* exhibe en el perro diferentes patrones que se han asociado con el tipo de respuesta inmune. Alrededor del 15% de los perros infectados es capaz de recuperarse y eliminar los parásitos espontáneamente (Fisa y col., 1999). Un segundo grupo de perros desarrolla signos clínicos severos de forma temprana tras un corto periodo de incubación. Este grupo se caracteriza por la incapacidad de desarrollar una respuesta inmune celular efectiva a pesar de generar una potente respuesta humoral, inefectiva para combatir el parásito. Un tercer grupo de perros puede persistir infectado durante largos periodos de tiempo, o incluso durante toda la vida, permaneciendo clínicamente sanos. Sin embargo, un cambio en el estatus inmunológico del animal puede dar lugar a la activación de una infección latente y el consiguiente desarrollo de signos clínicos (Baneth y col., 2008). Por tanto, los casos de LCan diagnosticados en la fase de afectación clínica representan la punta del iceberg en zonas endémicas, donde la mayoría de la población expuesta adquiere la infección y permanece sin evidencia clínica o respuesta serológica frente al parásito.

La susceptibilidad o resistencia a desarrollar LCan parece depender de multitud de factores tales como el estado nutricional, la presencia de infecciones concomitantes o la virulencia del parásito, entre otros. Recientemente, diversos autores han puntualizado la importancia que puede tener también el factor genético (Solano-Gallego y col., 2000; Quinnell y col., 2003; Sánchez-Robert y col., 2008).

Tanto los perros sintomáticos como los asintomáticos son infectivos para los flebotomos, lo que conlleva importantes implicaciones en la transmisión, epidemiología y control de la leishmaniosis (Molina y col., 1994; Guarga y col., 2000; Courtenay y col., 2002; Michalsky y col., 2007; Laurenti y col., 2013).

En la cuenca mediterránea se estima que existen al menos 2'5 millones de perros infectados respecto a una población total de unos 15 millones, lo que se traduce en una prevalencia media del 16'7% (Moreno y Alvar, 2002). Sin embargo, se piensa que estos datos de prevalencia, basados en encuestas serológicas, no son del todo realistas ya que estudios de detección molecular del parásito en perros seronegativos han arrojado datos de prevalencia muy superiores (Berrahal y col., 1996; Solano-Gallego y col., 2001). En nuestro país, se estima que aproximadamente entre el 8-9% de la población canina está infectada, aunque los valores de seroprevalencia oscilan según la región (Miró y Molina, 2006; Miró y col., 2012). Concretamente, en la Comunidad de Madrid (CM) la prevalencia alcanza cifras de entre 0 y 16'1% (Gálvez y col., 2010b; Miró y col., 2013).

#### **1.2.4.2 Otros reservorios de *L. infantum***

Durante las últimas décadas se han documentado numerosos casos de **gatos** infectados (Martín-Sánchez y col., 2007; Solano-Gallego y col., 2007; Maia y col., 2008; Cardoso y col., 2010; Millán y col., 2011; Sherry y col., 2011; Ayllon y col., 2012; Moreno y col., 2014). En la actualidad, el colectivo veterinario está incidiendo en la descripción de la clínica y en el avance de la epidemiología y control de la leishmaniosis felina (Maia y col., 2009; Pennisi y col., 2013). Además, estudios recientes mediante xenodiagnóstico han demostrado la infectividad hacia los flebotomos, concretamente *P. perniciosus* y *L. longipalpis*, de gatos naturalmente infectados (Maroli y col., 2007; da Silva y col., 2010). Por otro lado existe una notable seroprevalencia de la leishmaniosis felina en diversos países de la cuenca mediterránea, con valores que oscilan entre 1'7% y 68'0%. Se ha planteado, a la vista de estos datos, la posibilidad de que el gato esté actuando como un hospedador secundario en zonas donde la LCan es endémica, aspecto que aún está por dilucidar definitivamente (Maia y col., 2008; Maia y col., 2010; Maia y Campino, 2011).

En la Península Ibérica la infección por *L. infantum* ha sido descrita también en diversas especies de **animales silvestres**, lo que ha planteado la existencia de otros ciclos de transmisión independientes del doméstico. En España, se ha evidenciado la infección de carnívoros silvestres tales como lobos, zorros, lince, martas, ginetas, tejones, garduñas, gatos monteses, turones, visones europeos o mangostas, concretamente el meloncillo

(*Herpestes ichneumon*) (Marín-Iñiesta y col., 1982; Fisa y col., 1999; Criado-Fornelio y col., 2000; Portús y col., 2002; Sobrino y col., 2008; Millán y col., 2011; Del Río y col., 2013; Muñoz-Madrid y col., 2013). Así mismo, se ha identificado *L. infantum* en roedores (Morillas-Márquez y col., 1985; Fisa y col., 1999; Martín-Sánchez y col., 2004; Muñoz-Madrid y col., 2013), caballos (Portús y col., 2002; Solano-Gallego y col., 2003; Fernández-Bellón y col., 2006), ovejas y cabras (Fisa y col., 1999), erizos (Muñoz-Madrid y col., 2013) o incluso marsupiales en zoos (Ramírez y col., 2012). Sin embargo, aún está por determinar el papel concreto que juegan dichos animales infectados en la transmisión y epidemiología de la leishmaniosis en nuestro entorno.

Recientemente, **las liebres y los conejos** han sido incriminados como potenciales reservorios de *L. infantum* dada su capacidad de infectar a vectores competentes, como *P. perniciosus* (Molina y col., 2012; Jiménez y col., 2014). La prevalencia de la infección en liebres alcanza valores muy elevados en estudios realizados en diversas zonas de España (Ruiz-Fons y col., 2013) y en la zona de un brote epidémico de LV en Madrid (Moreno y col., 2014). En estudios recientes, se ha identificado ADN de *L. infantum* en el bazo de un conejo en el sureste de la Península Ibérica (Chitimia y col., 2011) además de seroprevalencias elevadas en conejos capturados en Madrid (García y col., 2014; Moreno y col., 2014) y en Granada (Díaz-Sáez y col., 2014).

## **1.2.5 Epidemiología de la leishmaniosis humana en España**

### **1.2.5.1 Reseña histórica**

Tan sólo unos años después de la primera descripción de *Leishmania* en la India por Leishman y Donovan en 1903 (Donovan, 1903; Leishman, 1903), Pittaluga notificó el primer caso de kala-azar infantil en nuestro país, en la comarca de Tortosa, provincia de Tarragona (Pittaluga, 1912). Un año más tarde, y en esa misma zona se registró el primer caso de LCan (Pittaluga, 1913).

Ambas formas clínicas de la enfermedad están presentes en España. Tradicionalmente se asoció la forma visceral con *L. infantum* mientras que *L. tropica* fue considerada como el agente etiológico de la LC. La identidad del agente responsable de los distintos cuadros clínicos fue aclarada definitivamente con la incorporación de métodos bioquímicos e isoenzimáticos que permitieron determinar con claridad la existencia de una única especie causante de todas las formas clínicas en España, *L. infantum*.

A principios del siglo XX, la leishmaniosis ya afectaba en España a un buen número de personas, sin embargo, resulta difícil hablar de cifras de casos. Además, la superposición con el paludismo en muchas zonas endémicas dio lugar a notorias confusiones. Por ello, cuando se iniciaron las campañas antipalúdicas en los años veinte, se comenzó a diagnosticar un mayor número de casos de kala-azar. Así, para el periodo de 1912 a 1947, se cifraban los casos registrados en 2.000 (Luengo-Arroyo y col., 1947). Posteriormente, se notificó un fuerte aumento del número de casos en los años cuarenta, coincidiendo con la época de la posguerra. Parece ser que los desplazamientos de la población durante la guerra civil española, así como la pobreza y falta de higiene, favorecieron este incremento (Ayala-Hurtado, 1947). Poco después, probablemente como consecuencia de las campañas antipalúdicas e introducción masiva de insecticidas, se produjo un descenso en la morbilidad (Botet-Fregola y Portús-Vinyeta, 1993).

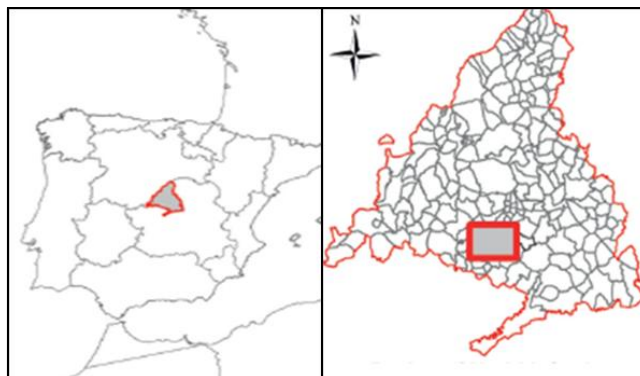
Tradicionalmente, los niños han sido los principales afectados por la leishmaniosis humana en la cuenca mediterránea. Sin embargo, la epidemia del SIDA, iniciada en los años ochenta, cambió por completo el panorama epidemiológico de la leishmaniosis en España, adquiriendo una importante relevancia la coinfección *Leishmania*-VIH. En consecuencia, el protagonismo de la leishmaniosis como enfermedad infantil se vio disminuido al dar paso a una enfermedad fuertemente asociada con adultos inmunocomprometidos (Alvar y Jiménez, 1994; Jiménez y col., 1995; Alvar y col., 1997; Jiménez y col., 1997; Alvar y col., 2008). Ambas enfermedades presentan un sinergismo que deriva de la afectación de las mismas células del sistema inmune. Por tanto, se considera que *Leishmania* es un patógeno oportunista en pacientes infectados por VIH (Alvar y col., 1997). De forma recíproca la infección por VIH aumenta el riesgo de sufrir leishmaniosis visceral de 100 a 1.000 veces en áreas endémicas (OMS, 2007). Desde los inicios de la epidemia del SIDA, España ha contabilizado el mayor número de casos de la coinfección en Europa, debido posiblemente al amplio solapamiento geográfico de ambas enfermedades y a la existencia de una tasa, por encima de la media europea, de adictos a drogas por vía parenteral (Cruz y col., 2006). Esta asociación cambió el patrón epidemiológico de la leishmaniosis, surgiendo un ciclo alternativo de carácter epidémico y antroponótico, en el que las jeringuillas usadas por los adictos a drogas por vía parenteral reemplazan a los flebotomos, considerándose al humano como reservorio del parásito (Alvar y Jiménez, 1994). Coincidiendo con la introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) en la mayoría de los países europeos en 1997, la incidencia de la coinfección en España disminuyó sustancialmente, pasando de 1.099 casos contabilizados en la década 1990-2001 a 130 casos en el periodo 2001-2006 (Alvar y col., 2008).

La leishmaniosis ha sido una Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) en España desde febrero de 1982, con 1.574 casos acumulados hasta diciembre de 1995 (Gil-Prieto y col., 2011). Sin embargo, a partir de un cambio en el sistema de vigilancia epidemiológica, esta enfermedad pasó a ser de notificación regional en 1996 lo que ha provocado una subdeclaración manifiesta, ya que no todas las comunidades autónomas han mantenido la obligatoriedad de la notificación, tan sólo notifican aquellas comunidades que consideran que la enfermedad es endémica. La implantación del Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD) en 1996, elemento esencial de los sistemas de información de la actividad asistencial hospitalaria, está aportando una información más realista sobre la incidencia de la leishmaniosis. Un exhaustivo análisis de la información de los registros de hospitalización por leishmaniosis durante los años 1997 a 2008, según datos del CMBD, ha arrojado cifras que elevan la tasa de hospitalización a 0´41 por cada 100.000 habitantes, siendo Madrid, las Islas Baleares y la costa mediterránea las zonas más afectadas. En este estudio la tasa de mortalidad se situó en 3´31% de los pacientes hospitalizados (Gil-Prieto y col., 2011). De forma similar, otro estudio reciente recoge la comparación de los datos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) y del CMBD durante el mismo periodo, poniendo de manifiesto la notable subdeclaración por parte de la RENAVE, estimada en un 50%. En este estudio, la RENAVE ha estimado una incidencia media anual de 0´45 casos por cada 100.000 habitantes para el periodo de 1996-2011 (Suárez-Rodríguez y col., 2012). Sin embargo, los datos del CMBD también muestran cierta descompensación con la realidad, ya que se notifican mayoritariamente casos viscerales, la forma de la enfermedad que requiere ingreso hospitalario.

Es importante destacar que, a partir del 1 de enero de 2014, la leishmaniosis ha pasado nuevamente a ser considerada una EDO a nivel nacional por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

#### **1.2.5.2 Brote epidémico de leishmaniosis en la Comunidad de Madrid**

La leishmaniosis es una enfermedad hipoendémica en la CM, donde se registran anualmente entre 12 y 25 casos (BECM). Actualmente está teniendo lugar un brote epidémico de leishmaniosis humana en el suroeste de la CM que desde julio de 2009 hasta enero de 2014 ha contabilizado 494 casos (6 en 2009, 97 en 2010, 196 en 2011, 156 en 2012 y 39 en 2013), lo que ha significado un incremento en la tasa de incidencia (TI) de la enfermedad en el área desde 2´44 casos por cada 100.000 habitantes en 2009 a 20´01 en 2013, según los datos suministrados por la Consejería de Sanidad de la CM.



**Figura 6. Localización del brote epidémico de leishmaniosis en la CM. Fuente: Imagen modificada de Arce y col. (2013).**

Son cuatro los municipios limítrofes afectados por este brote que en conjunto cuentan con una población de alrededor de 500.000 habitantes (Suárez-Rodríguez y col., 2012). Fuenlabrada es el municipio donde se concentran la mayoría de los casos ( $n=398$ ; 80'6%; TI: 44'55), seguido de Leganés ( $n=56$ ; 11'3%; TI: 6'65), Getafe ( $n=33$ ; 6'7%; TI: 4'31) y Humanes de Madrid ( $n=7$ ; 1'4%; TI: 6'58), según los datos facilitados por la CM.

Del total de los casos, 182 corresponden a LV (36'8%) y 312 a LC (63'2%). Cabe destacar que de los casos viscerales, la mayoría presentaron sintomatología clásica de LV, mientras que algunos se manifestaron de forma atípica, como leishmaniosis linfadenopáticas y mucosas (Aguado y col., 2013; Arce y col., 2013). Estudios epidemiológicos indican que el rango de edad es muy amplio, comprendido entre los 2 meses y los 95 años, siendo la mediana de 48 años. En la distribución respecto al sexo, el 61'3% de los afectados son hombres. Además, en el 16'8% de los casos existen factores intrínsecos asociados que podrían producir afectación del sistema inmune.

Sorprendentemente, no se ha detectado un incremento en la seroprevalencia de la LCan en los municipios afectados, situándose ésta en valores inferiores al 2%, dato derivado del análisis de los más de 1.500 perros estudiados durante 2011 y 2012 (Vilas y col., 2012). Esta seroprevalencia situada por debajo de la media de la CM (Gálvez y col., 2010b), dio lugar a la búsqueda de los potenciales reservorios silvestres en la zona, tales como gatos, ratas, conejos y liebres, que pudieran estar implicados en la transmisión del parásito. Se detectó ADN de *L. infantum* en bazo y/o piel del 29% de las liebres, además del 1'5% de los conejos y 7'3% de los gatos (Vilas y col., 2012). Serológicamente, la detección *L. infantum* se vio incrementada al 74'1% en liebres, 45'7% en conejos y 9'3% en gatos (Moreno y col., 2014). En estudios posteriores, se ha descartado la relevancia de los gatos como posibles reservorios del parásito en este brote (Miró y col., 2014). Además, la elevada población de

liebres presentes en la zonas verdes del brote (265 liebres/ km<sup>2</sup>) (Antoniou y col., 2013) propició que esta fuera la fuente de alimentación sanguínea preferida por los flebotomos de la zona durante la etapa inicial del brote (Jiménez y col., 2013). Mediante estudios de xenodiagnóstico se ha podido demostrar que liebres y conejos, seropositivos frente a *L. infantum* y aparentemente sanos, son capaces de infectar a *P. perniciosus*, el vector competente en la zona (Molina y col., 2012; Jiménez y col., 2014). Por tanto, estos estudios han constatado que ambos lepóridos están jugando un papel importante, aunque en diferente grado, como reservorios activos. Se puso así de manifiesto la existencia de un ciclo de transmisión silvestre, independiente del doméstico tradicional, vinculado a la periferia urbana (Molina y col., 2012; Arce y col., 2013; Jiménez y col., 2013; Jiménez y col., 2014).

Las investigaciones entomológicas llevadas a cabo durante 2012 y 2013 han determinado que el vector responsable de la transmisión es *P. perniciosus*, presente en densidades elevadas en la zona del foco, alcanzando 152´6 flebotomos/m<sup>2</sup> (Jiménez y col., 2014). Además, la detección molecular de ADN de *L. infantum* en flebotomos capturados en la zona de Fuenlabrada durante septiembre y octubre de 2011 ha arrojado cifras de prevalencia de la infección del 58´5% (Jiménez y col., 2013).

El 94´3% de los casos humanos han sido confirmados y se ha identificado *L. infantum* como agente etiológico (Suárez-Rodríguez y col., 2012; Arce y col., 2013). La caracterización molecular, basada en la secuencia de las regiones ITS<sub>1</sub> e ITS<sub>2</sub> de los aislados de los pacientes, ha permitido determinar un genotipo común para todas ellas, denominado Lombardi, que comparte el 100% de identidad con la secuencia de una cepa aislada en 1987 en la región de Madrid de un paciente con LC (Chicharro y col., 2013). Los aislados de liebres, conejos y flebotomos también comparten este genotipo (Molina y col., 2012; Jiménez y col., 2013; Jiménez y col., 2014).

Actualmente, la CM está llevando a cabo diversas medidas de control en la zona del brote, entre las que se incluyen:

- Vigilancia y control del reservorio, tanto de animales de compañía como de la fauna silvestre (recogida de animales abandonados, reducción de la población de liebres y conejos).
- Vigilancia vectorial, mediante la puesta en marcha de un plan de muestreos entomológicos en zonas urbanas y periurbanas afectadas por el brote, así como

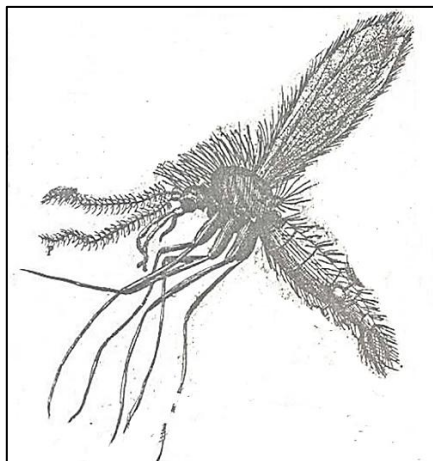
la adopción de medidas de control vectorial a través de intervenciones ambientales y realización de tratamientos con insecticidas.

- Educación poblacional: la Consejería de Sanidad de la CM y los ayuntamientos de las localidades afectadas están realizando campañas de información y educación sanitaria dirigidas a los ciudadanos y los profesionales de la zona.

### 1.3 Los flebotomos

#### 1.3.1 Identificación y posición taxonómica de los flebotomos

La descripción del primer flebotomo fue realizada en 1691 por Filippo Bonanni en el Viejo Mundo, (Figura 7) bajo el nombre de *Culex minimus* (Bonanni, 1691). Fue casi un siglo más tarde, en 1786, cuando Scopoli describió *Bibio papatasi*, siendo *Bibio* un género de moscas. Etimológicamente la palabra papatasi procede del italiano *papatacci*, que se traduciría como alimentador silencioso. El nombre del género *Phlebotomus*, cuyo significado es “que corta las venas” fue designado primeramente como *Flebotomus* por Rondani en 1840 y posteriormente corregido al término definitivo en latín por Agassiz en 1864 (Rondani, 1843; Feliciangeli, 2006).



**Figura 7. Primer dibujo de un flebotomo. Fuente: Bonanni (1691).**

Los flebotomos generalmente son identificados de acuerdo a sus caracteres morfológicos, principalmente estructuras internas como la espermateca, cibario y faringe, en las hembras, y externas como la genitalia en los machos. Existen otros muchos caracteres morfológicos que aportan información taxonómica, como la localización e intensidad de la pigmentación del tórax, la morfometría de las venaciones de las alas, las antenas y los segmentos de las patas, entre otros (Kato y col., 2010). Además, se han desarrollado diferentes marcadores moleculares con los que se está intentando solventar las dificultades



derivadas de la clasificación morfológica e incluso se están desarrollando técnicas proteómicas para asistir a la identificación (Dvorak y col., 2014).

Taxonómicamente los flebotomos son insectos nematóceros encuadrados en la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae. Los miembros de esta subfamilia se diferencian de otras subfamilias por la presencia de piezas bucales más largas que la cabeza, los palpos segmentados, las mandíbulas desarrolladas, las antenas casi cilíndricas y la vena radial del ala distribuida en cinco ramas (OPS, 2009). La clasificación de los Phlebotominae es confusa y lejos de ser definitiva. Esto se debe a la carencia de unas claves consenso para la identificación morfológica y al hecho de que para muchas especies no se han descrito todas las formas del ciclo vital. Además, la abrumadora cantidad de información que están arrojando las técnicas moleculares y la continua descripción de nuevas especies, hacen que la taxonomía y filogenia estén en permanente actualización como consecuencia de la dificultad en la reconstrucción de la historia evolutiva de estos insectos (Ready, 2013). Diferentes autores han propuesto distintas clasificaciones a nivel de género (Artemiev, 1991), sin embargo, la disparidad de opiniones se mantiene a nivel de subgénero y grupos de especies. En el Viejo Mundo, los flebotomos se agrupan, de acuerdo a una clasificación ampliamente aceptada, en los géneros *Sergentomyia*, *Phlebotomus* y *Chinius*. Sin embargo, la clasificación de los géneros que componen la subfamilia Phlebotominae en el Nuevo Mundo es muy controvertida. Generalmente se acepta la realizada por Lewis, quien propuso en 1997 una clasificación estable de la subfamilia Phlebotominae basada en criterios de importancia médica y conceptos biogeográficos. Agrupa las especies en tres géneros: *Brumptomyia*, *Warileya* y *Lutzomyia*. Revisiones de (Young y Duncan, 1994), y posteriormente Galati (2003), agrupan los flebotomos neotropicales en 22 géneros, clasificación apoyada en estudios de filogenia molecular de las secuencias de ADN ribosomal (Beati y col., 2004).

La predicción de propiedades ecológicas y vectoriales de los flebotomos a partir de su clasificación taxonómica es el objetivo final de muchos entomólogos. Sin embargo, los caracteres biomédicos no necesariamente requieren haber coevolucionado en una misma especie o incluso en un mismo género (Ready, 2011). De acuerdo a este concepto se está tratando de relacionar la información de la caracterización molecular con caracteres fenotípicos de utilidad en epidemiología. Por ejemplo, se ha relacionado la distribución de zimodemas de *L. major* con las diferentes poblaciones de *P. papatasi* (Hamarsheh, 2011).

### 1.3.2 Ciclo de vida

Los flebotomos son organismos holometábolos, ya que poseen un tipo de desarrollo con metamorfosis completa. Concretamente, en el ciclo vital de los flebotomos se suceden las fases de huevo (a), cuatro estadios larvarios terrestres (b), una pupa sésil (c) y, finalmente, el adulto (d, Figura 8). La diapausa puede tener lugar bien durante la fase de huevo o bien durante el último estadio larvario como ocurre generalmente en zonas con estaciones climáticas más extremas (Ready, 2013).

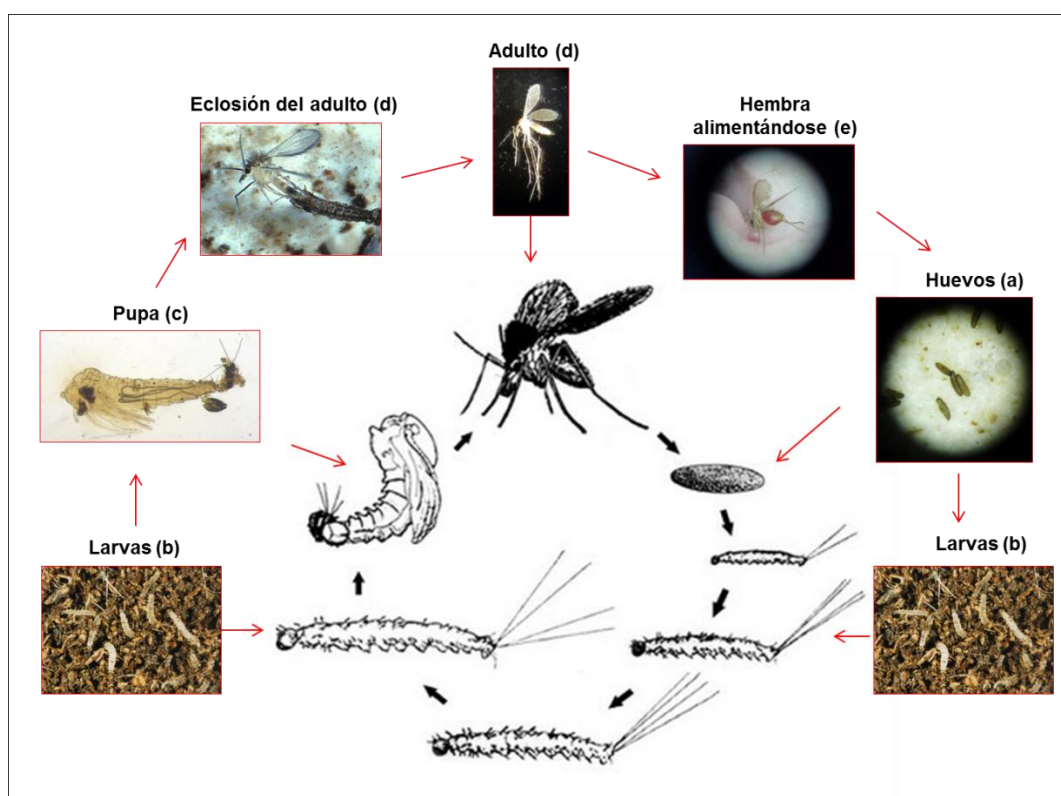


Figura 8. Ciclo vital de los flebotomos. A) Huevo. B) Larva. C) Pupa. D) Adulto. E) Hembra alimentándose sobre un hospedador vertebrado. Fuente: *The Wellcome Trust* (2000), UEM (ISCIII) y página web de Parasitología Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona (<http://pagines.uab.cat/parvet/>). Fuente de la imagen central: Rod Dillon ([http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life\\_cycle\\_habitats.htm](http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle_habitats.htm)).

Tras el apareamiento y alimentación con sangre (e), las hembras grávidas buscan un lugar adecuado donde realizar la puesta. El comportamiento del flebotomo en esta búsqueda está regido por una compleja interacción de factores fisiológicos y ambientales, entre los que destacan la temperatura, humedad y fotoperiodo. Además, existen sustancias químicas que provocan en la hembra grávida una fuerte atracción y estimulación para la oviposición, como es el caso de productos semioquímicos liberados por las heces de conejo, o feromonas que recubren los huevos conespecíficos, secretadas desde las glándulas

accesorias en el momento de la puesta (Dougherty y col., 1993;1994; Bray y Hamilton, 2007). Este comportamiento conlleva la agregación de huevos en los lugares de puesta, fenómeno ya descrito en otros dípteros hematófagos, que parece maximizar la supervivencia de la progenie (McCall y Cameron, 1995). Los lugares de oviposición preferidos suelen ser madrigueras, grietas, oquedades, terrenos muy húmedos con alto contenido orgánico, características que proveerán alimento y refugio a las futuras larvas (Munstermann, 2005; Sharma y Singh, 2008).

Cada puesta consta de 40-70 huevos de media, dependiendo de la especie, cantidad y calidad de la fuente alimenticia. Los **huevos (a)** son terrestres, poseen forma ovalada, coloración oscura, miden 0'3-0'5 mm de longitud y mediante microscopia electrónica exhiben patrones ornamentales de utilidad en taxonomía (Rogo y col., 1992; Fausto y col., 2001). El periodo de eclosión de la **larva (b)** suele oscilar entre 6 y 17 días, y es altamente dependiente de la temperatura (Claborn, 2010). Durante el periodo larvario, de 4 a 8 semanas de duración, los especímenes van progresando en tamaño a través de los 4 estadios larvarios. Las larvas son eucéfalas, con largas setas caudales sensoriales (un par en el primer estadio y dos pares en los restantes) y se alimentan de una amplia variedad de material orgánico. Debido a su carácter terrestre, poseen una cutícula gruesa y espinosa que las protege de la desecación, particularmente en zonas áridas. Las larvas son raramente empleadas en taxonomía, debido a la dificultad que entraña su captura en el campo. Se mueven lentamente, por lo que se desplazan una distancia mínima desde el lugar de la puesta. La exuvia que abandona la larva L4 al realizar la muda sirve de fijación de la **pupa (c)** al sustrato (Feliciangeli, 2006). La pupa, de pequeño tamaño (2 mm aproximadamente) y un color que varía de blanco a pardo oscuro, permanece inmóvil, aunque reacciona en respuesta a estímulos, con vigorosos movimientos del segmento anterior (Munstermann, 2005). Además, se han descrito sustancias repelentes liberadas por las pupas que podrían intervenir en mecanismos de defensa frente a la depredación o canibalismo (Dougherty y Hamilton, 1996). Tras unos diez días de maduración emerge el **adulto (d)**, caracterizado por su pequeño tamaño (3-5 mm) y por poseer la superficie corporal, alas y patas recubiertas de abundante pilosidad. Otra característica peculiar de los flebotomos adultos es la disposición de las alas en forma de uve creando un ángulo de 45 grados con el eje corporal, durante el reposo. Los flebotomos, de ojos grandes y oscuros, poseen antenas largas y filiformes divididas en 16 segmentos. El tórax forma una curva o giba que obliga a la cabeza a situarse por debajo, disposición más acusada en la hembra. Existe un marcado dimorfismo sexual, el macho alberga en los segmentos terminales el aparato reproductor o genitalia, en una posición tal, nada más eclosionar, que hace imposible la cópula. Se requieren unas 24 horas, tras la emergencia del macho adulto, para

que la genitalia rote 180°C, lo que permitirá el apareamiento. En *P. papatasi*, esta rotación se produce a las 7 horas (Chelbi y Zhioua, 2007). La hembra, de mayor tamaño, posee un aparato bucal más largo y desarrollado que le permite obtener sangre de los vertebrados. El aparato reproductor en ambos sexos, además de la disposición de las venas de las alas y el cibario, suponen los elementos principales para la clasificación taxonómica.

En flebotomos mantenidos en el laboratorio el ciclo completo dura alrededor de 6 semanas, dependiendo de las condiciones ambientales y la especie de flebotomo, sin embargo, es escasa la información que se tiene al respecto sobre especímenes capturados en el campo. La temperatura es uno de los factores que influye mayoritariamente en el tiempo de desarrollo. A bajas temperaturas se observa una notable ralentización del metabolismo, lo que se traduce en una prolongación del ciclo (Benkova y Volf, 2007). De la misma manera, se ha observado que en *P. papatasi* mantenido a una temperatura de 29-30°C, en vez de 27°C, se reduce el tiempo de desarrollo (Chelbi y Zhioua, 2007). Actualmente, estos estudios están adquiriendo especial relevancia en el contexto de la emergencia y reemergencia de la leishmaniosis bajo la premisa de cambio climático (Hlavacová y col., 2013).

Generalmente, los flebotomos realizan una única ingesta de sangre por cada ciclo gonotrófico, periodo comprendido entre una ingesta de sangre y la siguiente oviposición. Sin embargo, existen algunas excepciones, como es el caso de *P. papatasi* o *Phlebotomus longipes* que son capaces de realizar más de una alimentación sanguínea por cada ciclo (discordancia gonotrófica), hecho a tener en cuenta dadas las implicaciones epidemiológicas que este fenómeno tendría en la transmisión del parásito (Killick-Kendrick, 1983b).

Los flebotomos requieren proteínas de la sangre para la maduración de los huevos. Se conocen algunos casos de autogenia, fenómeno por el cual algunas especies son capaces de realizar la puesta de huevos fértiles en ausencia de alimentación sanguínea previa, como puede ocurrir en *P. papatasi* o *Lutzomyia lichyi* entre otros, con lo que se consigue el mantenimiento de la población en periodos de ausencia del reservorio (el-Kammah, 1973; Ready y Ready, 1981; Montoya-Lerma, 1992; Srinivasan y Panicker, 1993; Chelbi y Zhioua, 2007).

### **1.3.3 Biología del flebotomo**

#### **1.3.3.1 Longevidad y esperanza de vida**

El establecimiento de colonias de flebotomos en el laboratorio ha permitido esclarecer multitud de incógnitas sobre la biología de estos insectos, sin embargo, los datos arrojados sobre la esperanza de vida de los flebotomos en cautividad no reflejan la realidad de la naturaleza, ya que raramente las hembras sobreviven a la primera oviposición (Molina, 1994). En estudios de marcaje, liberación y recaptura llevados a cabo con *P. ariasi* en Francia, se recuperaron algunos flebotomos hasta 29 días después de su liberación (Killick-Kendrick y col., 1984b).

#### **1.3.3.2 Distribución y hábitat**

Los flebotomos se encuentran ampliamente distribuidos en las regiones templadas del planeta, incluyendo el sur de Europa, Asia, África, Australia y América. Su distribución se extiende desde los 50° latitud norte, coincidiendo con las zonas más septentrionales de Canadá, norte de Francia y Mongolia, hasta latitudes de unos 40° al sur, con la excepción de Nueva Zelanda y las islas del Pacífico, donde no se ha reportado la presencia de flebotomos (Killick-Kendrick, 1999). Sin embargo, la distribución no es estática y varía de acuerdo a factores ambientales y ecológicos, así se han detectado flebotomos en zonas tradicionalmente libres de estos insectos (Ready, 2010). Además, en contextos de ciclos urbanos y suburbanos de transmisión de leishmaniosis se ha puesto de manifiesto la adaptación de los flebotomos a entornos antrópicos cuyos asentamientos no presentan una distribución homogénea. En Posadas, Argentina, se ha demostrado que existen zonas diferenciadas de alta y baja densidad de flebotomos asociadas a las distintas características ecoepidemiológicas (Fernández y col., 2010; Santini y col., 2012).

Su distribución altitudinal es relativamente amplia, se han capturado flebotomos desde zonas por debajo del nivel del mar (Mar Muerto) hasta altitudes de 3.300 m, como es el caso de *Phlebotomus rupester* en Afganistán (Killick-Kendrick, 1999). Las diferentes especies de flebotomos presentan variaciones en su distribución altitudinal. Por ejemplo, *P. perniciosus* se localiza ampliamente distribuido en la Península Ibérica, siendo capaz de tolerar condiciones ambientales muy diversas, a diferencia de *P. ariasi* cuya presencia queda restringida a zonas de montaña donde el clima es más frío y húmedo (Gálvez y col., 2010a; Barón y col., 2011; Ballart y col., 2012).

### 1.3.3.3 Apareamiento

Los machos llevan a cabo un peculiar ritual de cortejo para atraer a las hembras, baten rápidamente las alas en las proximidades de la hembra y realizan movimientos característicos del abdomen. En este proceso de cortejo, intervienen las feromonas sexuales liberadas a través de la cutícula de los terguitos (Ward, 1993). Las diferencias existentes en las feromonas de *L. longipalpis* identificadas, mediante cromatografía de gases, como sustancias de estructura diterpénica o derivados del farnaseno, parecen intervenir en el aislamiento reproductivo de poblaciones simpátricas ya que podrían dar lugar a la ausencia de la copulación o incluso a afectar a la viabilidad de la descendencia (Ward y col., 1988; Ward y Morton, 1991; Hamilton y col., 1996). Recientemente, se han identificado y sintetizado estas feromonas en el laboratorio, con el fin de ser liberadas en la naturaleza para favorecer la captura de hembras (Bray y col., 2009).

En la atracción de las hembras por los vertebrados se sabe que la temperatura, el sudor, el dióxido de carbono y determinadas sustancias químicas secretadas por la piel o kairomonas juegan un papel importante (Hamilton y Ramsoondar, 1994). En el caso de algunas especies como *L. longipalpis*, *Lutzomyia migonei* y *Phlebotomus argentipes* los machos suelen alcanzar al hospedador vertebrado antes que las hembras, formando agregaciones que amplifican las señales de atracción hacia las hembras (Lane y col., 1990). En *L. longipalpis* estas señales están mediadas por una liberación de feromonas sexuales muy potente y una producción de sonidos con frecuencias características, al batir con rapidez las alas, involucrados también en la comunicación (Ward y col., 1988). Además, durante la alimentación sobre un vertebrado, las hembras de *P. papatasi* producen feromonas de agregación, liberadas desde los palpos, que atraen a otras hembras de las proximidades (Schlein y col., 1984).

Durante el proceso de apareamiento (Figura 9), tanto los machos como las hembras producen sonidos característicos al batir las alas, que han sido denominados “canciones de amor” (Ward y col., 1988; Vigoder y col., 2011). La presencia de feromonas sexuales y sonidos característicos no han sido demostrados en las especies pertenecientes al género *Phlebotomus*. Por otro lado, en algunas especies de flebotomos, como por ejemplo *P. ariasi*, el apareamiento se produce después de la alimentación con sangre (OMS, 2010).



**Figura 9. Apareamiento de *Phlebotomus perniciosus*. Fuente: UEM (ISCIII).**

Durante el apareamiento, el macho, ayudado por la armadura genital, sujeta a la hembra e introduce su aedago para depositar el espermatozoide directamente en la espermateca de la hembra, donde permanece hasta la fertilización de los huevos, momentos antes de la oviposición. Observaciones sobre *P. papatasi*, tanto capturados en el campo como mantenidos en el laboratorio, demostraron que al menos esta especie requiere de un apareamiento por cada ciclo gonotrófico, ya que utiliza todos los espermatozoides presentes en las espermatecas en cada ciclo gonotrófico (Chelbi y Zhioua, 2007). A la misma conclusión llegaron otros autores tras estudiar otras especies, entre ellas *P. perniciosus* y *P. ariasi* (Guilvard y col., 1985; Maroli y col., 1991).

#### **1.3.3.4 Dispersión y alcance de vuelo**

Los flebotomos recién emergidos, se mueven desde su lugar de cría para saciar sus necesidades de alimentación (tanto de sustancias azucaradas como de sangre) y para aparearse. Sin embargo, las hembras, tras la hematofagia, buscan un lugar para el reposo y digestión de la sangre ingerida, que puede ser dentro de la vivienda (endofilia) o en el exterior de la misma (exofilia), hábitos que difieren según la especie. Concretamente, *P. papatasi* posee hábitos endofílicos a diferencia de *P. ariasi* que se trata de una especie exofílica (Killick-Kendrick, 1983a).

Los flebotomos poseen un vuelo silencioso característico, en forma de pequeños saltos erráticos. Por lo general, su alcance de vuelo oscila entre los 200-300 m. De ahí que dentro de una misma región puedan existir zonas endémicas con multitud de casos de leishmaniosis y otras zonas relativamente cercanas con ausencia absoluta de casos. Se ha estimado que *P. ariasi* puede alcanzar una velocidad máxima de vuelo de 2'3-2'5 km/h (Killick-Kendrick y col., 1986). Mediante estudios de marcaje de flebotomos con polvos fluorescentes, liberación y recaptura, se han podido recuperar *P. papatasi* a 1'5 km e incluso

a 2'2 km de distancia en el caso de *P. ariasi* (Guy y col., 1984; Killick-Kendrick y col., 1984a). Además, el viento no ayuda a estos pequeños insectos a volar a mayor distancia, pues cesan su movimiento ante fuertes corrientes de aire. La velocidad del viento adecuada para el vuelo de *P. ariasi* debe ser menor de 2 m/s (Rioux y Golvan, 1969).

#### **1.3.3.5 Actividad**

Los flebotomos tienen actividad mayoritariamente nocturna, comenzando con la puesta del sol. Sin embargo, en este contexto *Lutzomyia wellcomei* es una excepción, por presentar actividad diurna y nocturna (Laison y col., 1973; Sharma y Singh, 2008).

Se han realizado multitud de estudios para determinar la actividad estacional de cada especie de flebotomo, fuertemente marcada por las características bioclimáticas de cada hábitat. Para ello, se realizan muestreos en el campo a intervalos regulares con el fin de capturar especímenes a lo largo del año. Estos estudios son de importancia extrema para estimar el periodo de transmisión de *Leishmania* spp. en una determinada zona y establecer el momento del año en el que el tratamiento con insecticida sería más efectivo.

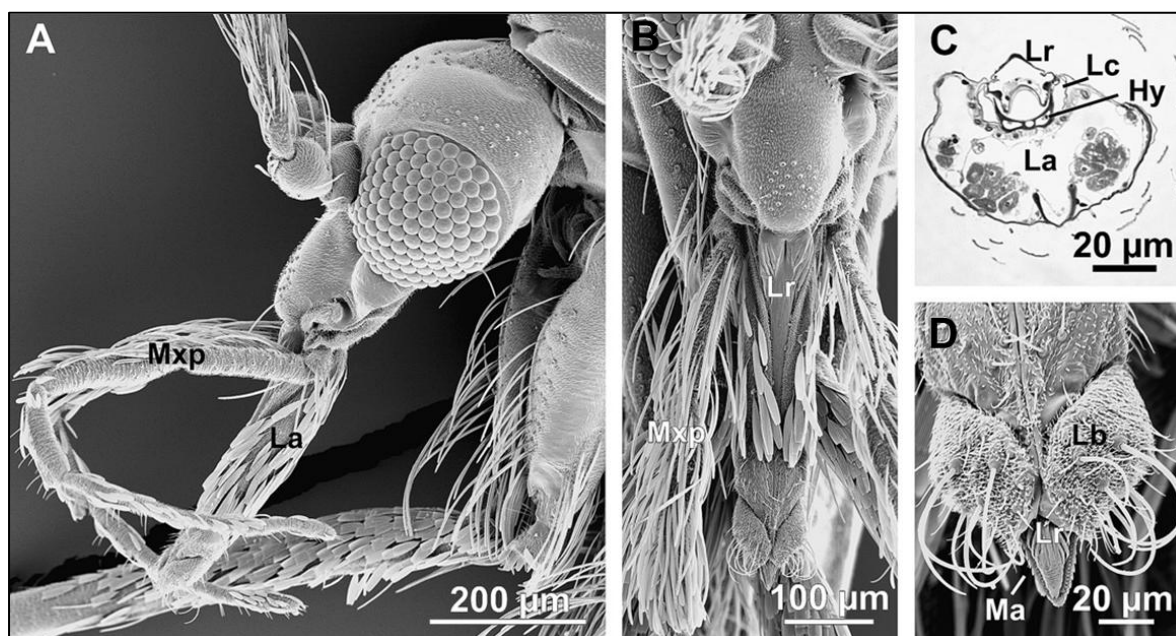
#### **1.3.3.6 Alimentación**

Al igual que otros dípteros hematófagos, los flebotomos de ambos sexos requieren carbohidratos como fuente de energía. Sin la ingesta de azúcares, la supervivencia de los flebotomos queda reducida a 2-5 días. Tan sólo las hembras necesitan alimentarse de sangre de vertebrados para poder producir huevos, por ello son las responsables de la transmisión de la leishmaniosis. Ocasionalmente se han capturado machos con sangre presente en el tubo digestivo, pero se ha asumido que esta sangre procede de la ingestión de sangre de heridas abiertas ya que los machos poseen un aparato bucal pobremente desarrollado que no les permite lacerar tejidos (Adler y Theodor, 1926). En la naturaleza, los flebotomos se alimentan de azúcares presentes en la savia de las plantas, néctar de flores y de ligamaza, sustancia azucarada secretada por pulgones (*Aphis* spp.) (Killick-Kendrick y Killick-Kendrick, 1987; Muller y Schlein, 2004). Las sustancias azucaradas son conducidas específicamente al divertículo esofágico, órgano de almacenamiento y esterilización de los carbohidratos ingeridos. Parece que existe un mecanismo de detección de azúcares por quimiorreceptores presentes en la unión del esófago con la válvula estomodeal (Adler y Theodor, 1926; Ribeiro y col., 1986; Tang y Ward, 1998b;1998a; Warburg, 2008).

El aparato bucal de los insectos ha evolucionado de diferentes maneras, dando lugar a diversas formas de alimentación (Fontaine y col., 2011; Krenn y Aspöck, 2012). En el caso



de los flebotomos, el aparato bucal está formado por una serie de estructuras (mandíbula, maxila, labro y labio) que actúan a modo de sierra, lacerando tejidos, fundamentalmente la maxila ya que posee un rango de movimiento superior al de las otras estructuras (Figura 10). La mandíbula, penetra y ensancha la herida en todas las direcciones.

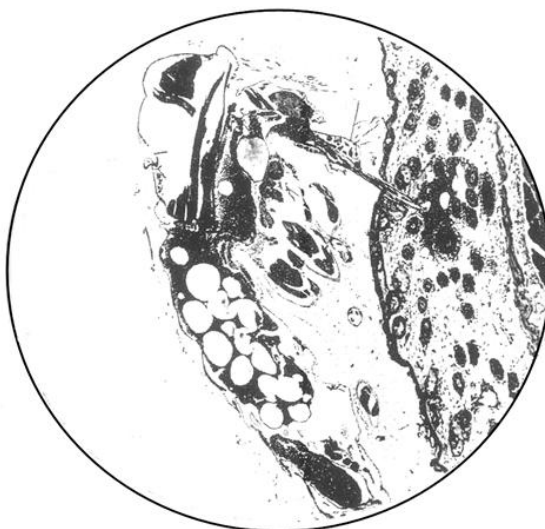


**Figura 10. Aparato bucal de *Phlebotomus duboscqi*.** A) Palpos maxilares (Mxp) que actúan como órganos sensoriales próximos a la probóscide. Las estructuras cortantes del aparato bucal están cubiertas por el labio (La). B) Vista frontal de la probóscide. C) Sección de la probóscide. El canal alimenticio se localiza entre el labro (Lr), hipofaringe (Hy) y lacinia (Lc). D) En la porción posterior de la probóscide se encuentran las labelas (Lb), con multitud de setas sensoriales, de las que sobresalen las estructuras cortantes (labro y mandíbulas). Fuente: Krenn y Aspöck (2012).

Al cortar los tejidos, se seccionan capilares dérmicos superficiales y se produce un cúmulo de sangre que es ingerido por los flebotomos gracias a un sistema de bombeo por presión negativa, mediante rápidos movimientos y contracciones de los músculos del aparato bucal (cibario y faringe), pudiendo llegar a producirse 120 contracciones por minuto (Adler y Theodor, 1926). Esta forma de alimentación a través de hematomas o acumulaciones de sangre se conoce como telmofagia (Ribeiro y col., 1986; Krenn y Aspöck, 2012). Además, durante este proceso, los insectos hematófagos inyectan saliva en el lugar de la herida a través del canal salival, que es independiente del canal alimentario.

Un aspecto a tener en cuenta es la profundidad de penetración de la piel por los flebotomos, ya que deben alcanzar la dermis para lacerar los capilares sanguíneos. La longitud del labro varía según la especie que oscila entre 0´1 mm para especies de *Sergentomyia* y 0´2 a 0´4 mm para diversas especies del género *Phlebotomus* (Lewis,

1987). Sin embargo, los flebotomos no introducen el labro en su totalidad (Figura 11), así la parte introducida en la piel supone una distancia ligeramente mayor a la mitad de la longitud del labro (Shortt y Swaminath, 1928). Además, el grosor de la epidermis varía en función de la especie, sexo y edad, lo que podría condicionar la transmisión de la leishmaniosis. La alimentación de los flebotomos sobre nódulos de leishmaniosis dérmica poskala-azar se ve favorecida porque la epidermis es más fina y los vasos sanguíneos se suelen encontrar dilatados en las capas superficiales de la dermis (Lewis, 1987).



**Figura 11. Corte sagital de *P. argentipes* fijado en el momento de la alimentación sanguínea. Fuente: Shortt y Swaminath (1928).**

Existe un intervalo de unos 15 a 30 segundos desde el inicio de la picadura hasta la entrada de sangre en la cavidad bucal del flebotomo, momento en el que los parásitos tienen la oportunidad de penetrar en la herida, ya que posteriormente durante la ingestión de sangre, la presión negativa creada por los músculos impediría el paso de los parásitos hacia el hospedador vertebrado, hecho de suma importancia en la transmisión (Adler y Theodor, 1926).

El esófago, conduce la sangre desde la faringe a través de la válvula estomodeal hasta el estómago, órgano distensible que almacena la sangre ingerida, cuyo volumen se ha estimado en 0'251  $\mu$ l de media en el caso de *L. longipalpis* alimentadas sobre ratones (Milleron y col., 2004a) y puede representar el 30% de su peso (Adler y Theodor, 1926). Las células epiteliales que tapizan el estómago secretan la membrana peritrófica que confina las células sanguíneas desde la válvula estomodeal hasta la unión con el intestino posterior, en cuyo interior se lleva a cabo la digestión de la sangre (Warburg, 2008). Esta membrana aísla y protege al flebotomo de posibles agentes infecciosos presentes en la sangre, así como de

los procesos enzimáticos que allí tienen lugar (Walters y col., 1993b). Finalmente, la sangre digerida es secretada en las heces. En la Figura 12 se muestra un flebotomo recién alimentado con sangre de criceto.



**Figura 12. A) Flebotomo recién alimentado. B) Disección del tubo digestivo repleto de sangre. Fuente: UEM (ISCIII).**

Los flebotomos, son insectos no sociales, sin embargo, se han observado comportamientos de agregación en el momento de la alimentación sanguínea, aportando ciertos beneficios como la reducción del tiempo de alimentación ocasionada por una maximización de los efectos de la saliva (Tripet y col., 2009).

### **1.3.4 Relación parásito-vector**

#### **1.3.4.1 Incriminación de vectores de la leishmaniosis**

Se han descrito alrededor de 800 especies de flebotominos, sin embargo tan sólo 93 son vectores, probables o probados, de *Leishmania* (OMS, 2010). Los criterios de inclusión como vectores descritos inicialmente por Killick-Kendrick y adoptados por la OMS se describen a continuación (Killick-Kendrick, 1990b; OMS, 2010).

- El flebotomo tiene que ser antropofílico. El modo de determinar el grado de antropofilia se evalúa mediante capturas utilizando cebo humano, o mediante la identificación del origen de la sangre ingerida por los flebotomos capturados.

- El flebotomo debe picar al reservorio. La mayoría de las leishmaniosis son zoonosis, por lo que el vector debe alimentarse de los hospedadores vertebrados implicados en el ciclo. Las preferencias alimentarias se demuestran estudiando el origen de la sangre ingerida por hembras capturadas en el campo.

- El vector debe encontrarse infectado en la naturaleza con la misma especie de *Leishmania* que causa la enfermedad en el hombre. Para ello se requiere el aislamiento de los parásitos mediante disección del tubo digestivo de los flebotomos. En este sentido, la información más valiosa se obtiene de parásitos aislados de hembras de flebotomo sin trazas de sangre ingerida en su tubo digestivo, lo que implicaría que esos parásitos son capaces de multiplicarse y evolucionar en el tubo digestivo del flebotomo a la vez que no son expulsados durante la digestión sanguínea.

- Los parásitos deben desarrollarse en el flebotomo, siendo capaces de evolucionar a las formas infectivas para el hospedador vertebrado (promastigotes metacíclicos) mediante el proceso de metaciclogénesis. Observaciones de la intensidad de las infecciones en flebotomos naturalmente infectados pueden complementarse con infecciones experimentales.

- El vector debe ser capaz de transmitir el parásito a través de la picadura. Este aspecto es difícil de demostrar en el laboratorio ya que, en condiciones experimentales, la mayoría de las hembras no sobreviven a la oviposición y, por tanto, es muy complejo reproducir una picadura infectiva.

Recientemente, se han incorporado nuevos criterios de inclusión derivados de una definición más global de la leishmaniosis basada en aspectos epidemiológicos y matemáticos (Ready, 2013):

- Debe existir una asociación ecológica entre la estacionalidad de los flebotomos vectores, humanos y, en su caso, reservorios.

- Usando modelos matemáticos con datos retrospectivos se debe demostrar que el vector es esencial en el mantenimiento de la transmisión.

- Los programas de control vectorial deben estar apoyados en estudios de modelaje matemático que avalen una futura disminución de la incidencia de la enfermedad.

#### **1.3.4.2 Permisividad**

La combinación de factores ecológicos y moleculares tiene como resultado la interacción específicamente selectiva entre parásito y vector. Existen flebotomos capaces de actuar como vectores de varias especies de *Leishmania* o, por el contrario, otros flebotomos tan sólo pueden actuar como vectores de una sola especie de *Leishmania*, lo que se conoce como vectores permisivos y específicos respectivamente. Estas relaciones están reguladas por las interacciones parásito-flebotomo. Los principales factores que afectan al desarrollo completo de *Leishmania* en el vector son fundamentalmente la modulación de las enzimas proteolíticas liberadas en el tubo digestivo tras la ingesta de sangre, la salida del parásito de la membrana peritrófica y la excreción del contenido abdominal tras la digestión de la sangre (Sacks y Kamhawi, 2001). Por ejemplo, *L. major*, a diferencia de *L. donovani*, es capaz de disminuir la actividad de las enzimas digestivas de *P. papatasi*. Este hecho podría tener relación con la supervivencia y desarrollo de dichas especies de *Leishmania* en *P. papatasi*, explicando la refractariedad de este vector a *L. donovani* (Borovsky y Schlein, 1987). El anclaje de *Leishmania* se realiza a través de la unión de glicoconjugados (lipofosfoglicano: LPG) a lectinas del tubo digestivo del flebotomo. Gran parte de los fenómenos de especificidad se han atribuido a estas uniones (Volf y Myskova, 2007). En vectores permisivos, se ha demostrado que existen mecanismos de unión diferente, independiente del LPG (Myskova y col., 2007). Por ejemplo, *P. papatasi* o *P. sergenti* son vectores específicos ya que únicamente son capaces de transmitir *L. major* o *L. tropica*, respectivamente, a pesar que se localizan en zonas donde existen otras especies de *Leishmania* (Sacks, 2001). Entre los flebotomos permisivos se incluyen *L. longipalpis*, *P. argentipes*, *Phlebotomus halepensis* y *Phlebotomus arabicus* (Walters y col., 1993a; Pimenta y col., 1994; Sadlova y col., 2003; Svobodova y col., 2006). Sin embargo, esta clasificación es una simplificación de las complejas interacciones que tienen lugar entre el parásito y el vector. De hecho, algunos flebotomos presentan una especificidad intermedia ya que son capaces de albergar el desarrollo de muchas especies de *Leishmania* pero no de todas (Volf y Myskova, 2007). Al menos en *P. papatasi*, estudios sobre la susceptibilidad o refractariedad a diferentes líneas de *L. major* han confirmado que estos fenotipos están controlados genéticamente, aunque los genes implicados aún no han sido identificados (Wu y Tesh, 1990a;1990b).

#### **1.3.4.3 Ciclo intravectorial de *Leishmania* spp. en el flebotomo**

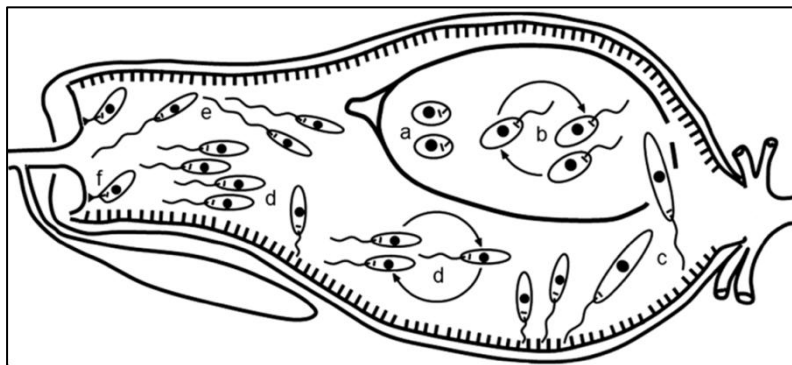
El parásito evoluciona en el flebotomo desde las formas amastigotes, presentes en el interior de los macrófagos, hasta promastigotes infectivos que se instalan en la parte anterior

del tubo digestivo, adaptados a la futura supervivencia en el hospedador vertebrado. Este proceso se denomina metaciclologénesis (Figura 13). Las variaciones en las condiciones de temperatura y pH entre el hospedador vertebrado y el vector son las que inducen el desarrollo del parásito (Bates y Rogers, 2004).

El ciclo de *Leishmania* en el invertebrado está confinado al tracto digestivo. La localización del desarrollo de los parásitos en el tubo digestivo diferencia a los subgéneros de *Leishmania*. Las especies del subgénero *Viannia* en el Nuevo Mundo (*L. braziliensis*) colonizan la región anterior del tubo digestivo posterior antes de migrar hacia la válvula estomodeal. En el subgénero *Leishmania* el desarrollo queda restringido al intestino medio (Lainson y col., 1977).

Cuando una hembra de un flebotomo se alimenta de un hospedador vertebrado infectado, la sangre, con macrófagos parasitados o amastigotes libres, es ingerida y depositada en la región abdominal (Bates, 2007), donde es rápidamente englobada por la membrana peritrófica, cuya síntesis comienza una hora después de la alimentación, en *L. longipalpis* o *P. perniciosus*, o a las 4 horas como sucede en *P. papatasi*. Está completamente formada a las 24 horas (Secundino y col., 2005). Posteriormente, en el interior de la membrana peritrófica comienza el proceso de digestión de la sangre, en el que se lisan los macrófagos, liberándose los **amastigotes** (Figura 13A), que se transforman en las primeras 12-18 h en **promastigotes procíclicos** (Figura 13B), de pequeño tamaño (6-8 µm de longitud del cuerpo) y de escasa movilidad, debida a su corto flagelo (Sacks y Kamhawi, 2001; Kamhawi, 2006). Estos son capaces de replicarse en la sangre y se pueden encontrar en forma de rosetas, con el flagelo orientado hacia el centro, durante esta primera fase de multiplicación rápida que tiene lugar en las primeras 36-60 h. Los promastigotes comienzan a retardar su replicación y se diferencian en formas alargadas (12-20 µm), altamente móviles, denominadas **nectomonas** (Figura 13C), las cuales se acumulan en la parte anterior de la membrana peritrófica, de donde escapan, evitando así su expulsión con las heces. La secreción en unos casos de quitinasas por parte del parásito o incluso las enzimas endógenas del flebotomo en otros, facilitan el escape de la membrana peritrófica (Schlein y col., 1991; Ramalho-Ortigao y col., 2005). Una vez liberados, los promastigotes se anclan a la pared del intestino medio introduciendo su flagelo entre las microvillosidades de la pared intestinal, evitando su expulsión con las heces (Killick-Kendrick y Rioux, 1991). Las nectomonas avanzan en su multiplicación por el intestino medio, hacia su región anterior (Bates, 2007). El lipofosfoglicano (LPG), molécula formada por una cadena lineal de unidades repetidas de galactosa y manosa unida a un núcleo glicolípídico (Ilg, 2000), recubre toda la superficie celular de *Leishmania*, incluyendo el flagelo y juega un papel

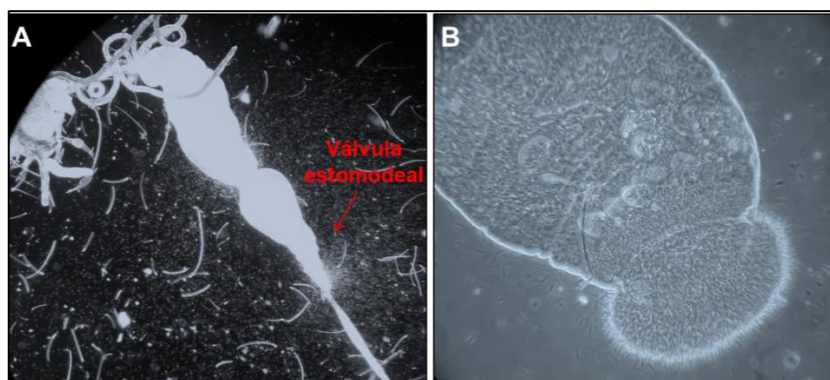
esencial en la adhesión del parásito al tubo digestivo (Sacks y col., 2000). Parásitos deficientes en LPG no son capaces de anclarse y son eliminados durante la defecación de la digestión de la sangre (Bates y Rogers, 2004). En *P. papatasi* se ha identificado el receptor del tubo digestivo del flebotomo al que se une el LPG de *L. major*, se trata de una glectina denominada PpGalec (Pimenta y col., 1992; Kamhawi y col., 2004).



**Figura 13. Desarrollo de especies suprapilóricas de *Leishmania* en el tubo digestivo del flebotomo. A) Amastigotes. B) Promastigotes procíclicos. C) Nectomonas. D) Leptomonas. E) Promastigotes metacíclicos. F) Haptomonas. Fuente: Imagen modificada de Dostalova y Volf (2012).**

Posteriormente, la migración de parásitos hacia la región torácica del intestino medio continúa y, una vez que alcanzan la válvula estomodeal, las nectomonas se diferencian en **leptomonas** (Figura 13D), formas más cortas (6-8  $\mu\text{m}$ ) capaces de entrar en un nuevo ciclo proliferativo (Gossage y col., 2003). En esta fase se hace patente la aglomeración de fosfoglicanos secretados por los parásitos formando un tapón gelatinoso (PSG: *promastigote secretory gel*) que obstruye la válvula estomodeal (Rogers y col., 2002). Algunas de las nectomonas/leptomonas se anclan a esta válvula y se diferencian en formas de cuerpo ancho y corto (5-8  $\mu\text{m}$ ) o **haptomonas** (Figura 13F), que se organizan en anillos concéntricos bloqueando también la válvula (Kamhawi, 2006). Al ser la válvula estomodeal una invaginación de origen ectodérmico (cuticular) este anclaje a su superficie se realiza mediante mecanismos diferentes, mediado por la expansión de la membrana flagelar en estructuras similares a hemidesmosomas (Killick-Kendrick, 1990a; Wakid y Bates, 2004). Estos promastigotes producen quitinasas, que dañan la válvula estomodeal, proceso de alta relevancia en la transmisión. En infecciones avanzadas también pueden encontrarse **paramastigotes** anclados a la parte anterior del tubo digestivo. Estas formas poseen el núcleo adyacente al kinetoplasto (Bates y Rogers, 2004). Finalmente algunas leptomonas evolucionan a **promastigotes metacíclicos** (Figura 13E), formas no proliferativas, de cuerpo pequeño y delgado (5-8  $\mu\text{m}$ ), altamente móviles y con un flagelo largo (por lo menos dos veces la longitud del cuerpo) que suelen aparecer a partir del quinto día de la ingestión

de la sangre infectada (Rogers y col., 2002). Los promastigotes metacíclicos expresan un tipo de LPG modificado que no permite el anclaje al epitelio intestinal, lo que asegura su localización y disponibilidad para la transmisión (Bates y Rogers, 2004). Estas formas parasitarias son las realmente infectivas para el hospedador vertebrado y exhiben una serie de características de preadaptación a la supervivencia en el mamífero, como por ejemplo la resistencia a la lisis mediada por complemento (Handman y Bullen, 2002; Moreno y col., 2007). En la Figura 14 se muestra en detalle el tubo digestivo de un flebotomo infectado experimentalmente con *L. infantum*.



**Figura 14. Disecciones del tubo digestivo de *P. perniciosus* infectados experimentalmente con *L. infantum*. A) Tubo digestivo completo. B) Válvula estomodeal repleta de parásitos. Fuente: UEM (ISCIII).**

El movimiento de los promastigotes en el tubo digestivo no es aleatorio y la migración hacia la parte anterior parece estar regida por procesos osmóticos y quimiotácticos (Barros y col., 2006). La saliva de los flebotomos está implicada en dichos procesos migratorios al actuar como quimioatrayente (Cavalcante y col., 2006). Además, la saliva puede contribuir a la diferenciación de los parásitos ya que detiene específicamente la multiplicación de *Leishmania*, sin afectar su viabilidad, y promueve la diferenciación celular de los promastigotes. En estudios realizados *in vitro*, la saliva produce cambios en la morfología de los parásitos observándose altos porcentajes de promastigotes alargados de tipo nectomonas (Charlab y Ribeiro, 1993; Charlab y col., 1995).

#### **1.3.4.4 Transmisión de la leishmaniosis**

##### **1.3.4.4.1 Transmisión vectorial**

La transmisión de *Leishmania* spp. a un hospedador vertebrado se produce en el momento en el que un flebotomo infectado se alimenta de dicho hospedador. Las primeras evidencias experimentales de la transmisión vectorial de la leishmaniosis se obtuvieron a



finales de los años 20 en experimentos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación en los que se consiguió transmitir el parásito a animales de laboratorio a través de la picadura de un flebotomo (Christophers y col., 1925; Shortt y col., 1931; Napier y col., 1933). Los posibles mecanismos de transmisión más relevantes se describen a continuación.

- Los promastigotes son **inoculados** en la dermis durante la picadura y, por ello, un requisito para la transmisión es la existencia de parásitos en la probóscide. Esta teoría se apoya en la aparición de lesiones en zonas adyacentes de la piel en las que los flebotomos infectados habían insertado su aparato bucal por cortos periodos de tiempo y sin embargo no habían conseguido obtener sangre o sólo parcialmente (Killick-Kendrick y col., 1977). Más adelante, esta teoría se tornó más consistente cuando un voluntario desarrolló 11 lesiones debido a los intentos de picadura de un único flebotomo infectado (Beach y col., 1984).
- Los promastigotes son **regurgitados** en el momento de la picadura debido a que el canal alimentario está bloqueado por multitud de promastigotes agolpados, lo que hace necesario su expulsión previa a la ingestión de sangre, de forma similar al mecanismo de transmisión de *Yersinia pestis* por las pulgas (Bates, 2007). Posteriormente, se han incorporado nuevas evidencias que apoyan esta hipótesis, por lo que actualmente cuenta con la valoración favorable de la comunidad científica. Una de ellas es la clara disfunción que presenta la válvula estomodeal en flebotomos infectados, lo que provoca una alteración en el proceso de ingestión de la sangre y favorece la regurgitación de los promastigotes (Schlein y col., 1992). Evidencia del daño causado a la válvula estomodeal ha sido documentada en los modelos de *L. major-P. papatasi*, *L. major-P. duboscqi* y *L. infantum-L. longipalpis*, e incluso se ha postulado que además de las quitinasas secretadas por el parásito, otras enzimas parasitarias como la leishmanolisina gp63 podrían estar implicadas en este daño celular (Volf y col., 2004). Recientemente, se está dando elevada importancia al papel del PSG en la transmisión, ya que produce una obstrucción física de la parte anterior del tubo digestivo. Además, la gran dimensión del tapón, provoca un incremento de presión que puede forzar a la válvula estomodeal a mantenerse abierta y así facilitar el reflujo (Bates y Rogers, 2004). El PSG está compuesto mayoritariamente por glicoproteínas de elevado peso molecular denominadas proteofosfoglicano filamentoso (fPPG) que forman una estructura gelatinosa de red filamentosa en la que se encuentran embebidos los promastigotes leptomonas y promastigotes metacíclicos infectivos, fundamentalmente

localizados en los extremos del tapón, en una posición idónea para iniciar la transmisión (Bates, 2007; Rogers, 2012). Estos promastigotes embebidos en el PSG muestran una apariencia inmóvil, pero al liberarse el tapón se disuelve y los parásitos recuperan la movilidad (Bates y Rogers, 2004). La obstrucción del tubo digestivo por el PSG o por los propios parásitos agolpados en la parte anterior da nombre a la hipótesis de la transmisión por regurgitación (*blocked fly*).

- Otra posibilidad es que las formas infectivas puedan ser inoculadas junto con la **saliva** a través de los conductos salivales, ya que se han observado promastigotes en las glándulas salivales de flebotomos, experimentalmente infectados (Killick-Kendrick y col., 1996) y naturalmente infectados (Naiff y col., 1991). Además, recientes observaciones realizadas en Brasil han documentado la presencia de promastigotes en las glándulas en 18 de 60 flebotomos disecados, sugiriendo que podría tratarse de un paso más en el ciclo de *Leishmania* (Freitas y col., 2002). Hoy en día, no existe una evidencia clara de esta vía de transmisión, sin embargo, son precisos más estudios en esta línea para aclarar la relevancia de estos hallazgos.
- Otra observación interesante, aunque no relacionada actualmente con el mecanismo de transmisión, es la aparición de promastigotes de *L. major* en la **orina** de flebotomos infectados, a través de un proceso de prediuresis o concentración de los componentes celulares de la sangre durante la alimentación sanguínea, mediante el cual se elimina el exceso de líquido en gotas expulsadas a través del ano (Sadlova y col., 1999).

El número de promastigotes necesarios para iniciar una infección no se conoce exactamente. Parece depender del hospedador vertebrado y de las combinaciones *Leishmania*-flebotomo, pero la dosis de promastigotes metacíclicos inoculados parece encontrarse en números muy bajos, en comparación con las dosis generalmente utilizadas en las infecciones experimentales (Warburg y Schlein, 1986; de Almeida, 2002; Rogers y col., 2004; Kimblin y col., 2008; Rogers y col., 2010; Maia y col., 2011). Estudios recientes han demostrado que existe una amplia variabilidad en la dosis que puede oscilar entre 4 promastigotes y  $4 \times 10^4$  en el modelo estudiado de *L. infantum* en *P. perniciosus* y *L. longipalpis* (Maia y col., 2011). En el modelo experimental de *P. duboscqi*-*L. major*, se demostró que la dosis inoculada por los flebotomos infectados seguía una clara distribución bimodal con una dosis mayoritaria que se correspondía con menos de 600 promastigotes por picadura y una dosis elevada de entre 1.000 y 100.000 (Kimblin y col., 2008).

Se han identificado ácidos nucleicos de *Leishmania* en diversos artrópodos hematófagos, como garrapatas, pulgas o tábanos (Coutinho y col., 2005; Colombo y col., 2011; Coelho y Bresciani, 2013; Moraes y col., 2013), sin embargo estas observaciones no implican necesariamente que el parásito se encuentre en su forma viable, sea capaz de sufrir metaciclogénesis o que estos artrópodos puedan transmitir el parásito a través de su picadura. Recientemente, se han observado en Australia evidencias que involucran a *Forcipomyia (Lasiohelea)* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) como vector de *Leishmania enrietti* entre marsupiales, ya que, además de cumplir otros criterios, especímenes capturados en el campo mostraron un patrón de desarrollo por *L. enrietti* muy similar al descrito en los flebotomos, con formación de promastigotes metacíclicos agolpados en la válvula estomodeal e incluso la presencia de una sustancia gelatinosa similar al PSG (Dougall y col., 2011). Además, se ha detectado ADN de *L. infantum* en *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) capturados en Túnez (Slama y col., 2014). Sin embargo, en un estudio reciente *L. major* y *L. infantum* no pudieron completar su desarrollo en *Culicoides nubeculosus*, ya que, en esas infecciones experimentales, tras la supervivencia y multiplicación inicial, los parásitos no fueron capaces de adherirse al tubo digestivo del insecto, siendo expulsados con las heces (Seblova y col., 2012).

#### **1.3.4.4.2 Transmisión no vectorial**

Ocasionalmente, se han documentado otras formas de transmisión no vectorial, independiente de los flebotomos, que podrían tener relevancia en algunos casos. Concretamente, se ha demostrado la transmisión por contacto de derivados sanguíneos infectados, como transfusiones (Owens y col., 2001), trasplantes (Antinori y col., 2008) o a través del uso compartido de jeringuillas en adictos a drogas por vía parenteral (Cruz y col., 2002). Además, la LCan en sus estadios avanzados se caracteriza por la diseminación de parásitos en sangre, piel, órganos internos, saliva, semen, conjuntiva y tracto genital; por lo que se ha sugerido la transmisión por mordedura, contacto directo, vía venérea o congénita (Quinnell y Courtenay, 2009). Existen estudios sobre la transmisión congénita o venérea de *Leishmania* spp. en perros que han proporcionado datos de frecuencias relativamente elevadas (Masucci y col., 2003; Silva y col., 2009). Estas vías podrían dar explicación a los brotes de leishmaniosis ocurridos en perreras estadounidenses, en ausencia de flebotomos (Gaskin y col., 2002).

### **1.3.4.4.3 Otros factores que influyen en la transmisión de la leishmaniosis**

#### **1.3.4.4.3.1 Factores ambientales**

La temperatura afecta al metabolismo del flebotomo y al desarrollo de *Leishmania* spp. en su tubo digestivo, influyendo directamente en la capacidad vectorial (Benkova y Volf, 2007; Hlavacová y col., 2013; Macedo-Silva y col., 2014). Además, se han descrito otros factores tales como la elevada concentración de aluminio en el ambiente en zonas volcánicas que puede constituir un adyuvante natural en la transmisión de *Leishmania* spp. (Maingon y col., 2008).

#### **1.3.4.4.3.2 Manipulación de la fisiología del vector por parte del parásito.**

*Leishmania* spp. modifica el comportamiento alimenticio de los flebotomos de tal manera que los flebotomos infectados presentan dificultades para obtener sangre de su hospedador vertebrado, resultando en una prolongación del tiempo empleado en intentar picar y en una alimentación parcial (Jefferies y col., 1986). Además, en presencia de formas infectivas del parásito, la alimentación del flebotomo se vuelve más persistente (Rogers y Bates, 2007). Estos cambios fisiológicos derivan en un incremento en la eficiencia de la transmisión del propio parásito (Beach y col., 1985), hecho ya documentado en otros vectores hematófagos como culícidos (Grimstad y col., 1980; Rossignol y col., 1985; Wekesa y col., 1992) y triatominos (García y col., 1994).

#### **1.3.4.4.3.3 PSG**

Las formas infectivas del parásito son inoculadas por el vector junto con el tapón gelatinoso PSG y la saliva del flebotomo. Estas dos últimas sustancias influyen en la transmisión de la leishmaniosis. Incluso se ha demostrado un efecto sinérgico de ambos componentes (Rogers, 2012).

El PSG bloquea la parte anterior del tubo digestivo y la válvula estomodeal y como resultado los promastigotes metacíclicos son regurgitados en el intento de alimentación sanguínea, lo que se traduce en una mejora de la eficiencia de la transmisión de *Leishmania* spp. El efecto del PSG ha sido demostrado en modelos experimentales de LC causada por *L. mexicana* (Rogers y col., 2004) y LV causada por *L. infantum* (Rogers y col., 2010).

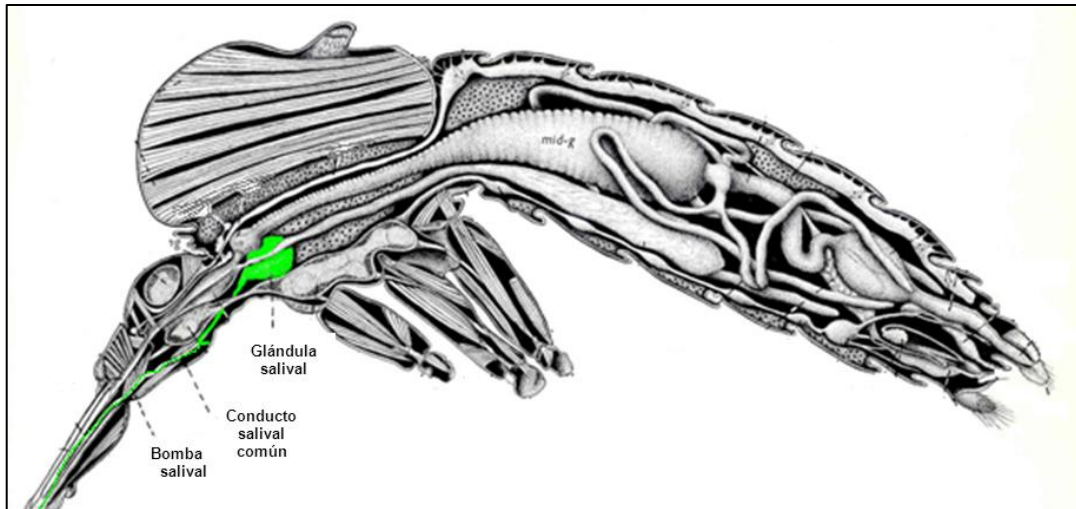
La influencia de la saliva en la transmisión de *Leishmania* se detalla en el Apartado 1.4.4.1.

## **1.4 La saliva de los flebotomos**

### **1.4.1 Fisiología de las glándulas salivales**

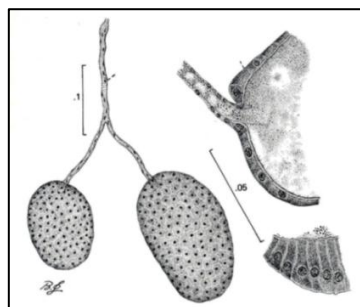
Las glándulas salivales son los órganos responsables de la producción de saliva, un fluido heterogéneo compuesto por una variedad de sustancias que es inoculado a través de la piel de los mamíferos cuando los insectos intentan alimentarse de estos. Hay una variación considerable en la morfología, estructura y contenido de las glándulas salivales de los diferentes artrópodos. Se conocen al menos dos tipos de glándulas salivales, tubulares y alveolares, según la organización de la capa de células epiteliales que las forman. Concretamente, las glándulas tubulares están constituidas por una capa de células que almacenan los productos de secreción en vesículas apicales que rodean un conducto central, donde liberan la saliva. A partir de ahí es conducida por el aparato bucal con ayuda de la bomba salival. Las glándulas salivales de los culícidos son un ejemplo de glándulas tubulares. Contrariamente, las glándulas alveolares, presentes en las garrapatas, están formadas por conductos ramificados, de morfología similar a un racimo de uvas (Valenzuela, 2005).

El aparato salival de los flebotomos, de tipo tubular, consta de dos glándulas salivales, dos conductos salivales, que convergen en un conducto salival común, y una bomba salival que fuerza la salida de la saliva a través del estrecho canal esclerotizado de longitud similar a la probóscide. Se conduce así la saliva hacia la herida a través de la hipofaringe (Figura 15) (Adler y Theodor, 1926). Los lóbulos salivales se localizan a cada lado de la parte más ventral del tórax y están constituidos por una capa de células epiteliales que descansa sobre una membrana basal. En culícidos, existe una diferenciación de las funciones de las células que componen las glándulas; las células localizadas en el lóbulo anterior se asocian con la secreción de enzimas relevantes en el metabolismo de azúcares, mientras que las células del lóbulo posterior se asocian con la secreción de moléculas implicadas en el metabolismo sanguíneo (Valenzuela, 2005).



**Figura 15. Aparato salival de un flebotomo. En verde se destacan las glándulas salivales, el conducto salival común y la bomba salival. Fuente: Imagen modificada de Jobling (1978).**

Una glándula totalmente distendida puede medir  $180\ \mu\text{m} \times 140\ \mu\text{m}$  para especímenes del género *Phlebotomus*, siendo las glándulas de *Lutzomyia* de menor tamaño (Adler y Theodor, 1926; Nieves y col., 2011). Existe heterogeneidad entre la forma y el contenido de las glándulas según las especies y el sexo. De hecho, los dos lóbulos salivales, de forma redondeada, suelen presentar un tamaño ligeramente diferente entre ellos (Figura 16), observándose en varias especies que el lóbulo derecho es mayor que el izquierdo (Nieves y col., 2011; Abdel-Badei y col., 2012). El volumen de saliva contenido en un par de glándulas salivales se estima que es de 35 nl (Adler y Theodor, 1926)



**Figura 16. Detalle de las glándulas salivales de *P. papatasi*. Escala en mm. Fuente: Imagen modificada de Jobling (1978).**

### 1.4.2 Función de la saliva

La saliva de los insectos hematófagos además de lubricar, limpiar las piezas bucales y ayudar en la digestión de azúcares y sangre, contiene una serie de sustancias bioactivas que modifican la respuesta homeostática e inmune del hospedador en el lugar de la picadura para poder asegurar el éxito de la ingurgitación de sangre (Krenn y Aspöck, 2012). Concretamente, durante la hematofagia, los flebotomos tienen que hacer frente a los tres grandes eventos de la hemostasia: agregación plaquetaria, vasoconstricción y coagulación sanguínea, para lo que inyectan la saliva en el lugar de la picadura, contrarrestando así estos efectos (Fontaine y col., 2011; Rochael y col., 2013).

La agregación plaquetaria es la primera línea de defensa para evitar pérdidas de sangre durante un proceso hemorrágico. Las plaquetas se activan por diversos agonistas incluyendo trombina, colágeno y ADP que finalmente se agregan formando el trombo plaquetario. La mayoría de los insectos hematófagos **inhiben la agregación plaquetaria** mediante la acción de las apirinas salivales. Sin embargo, existen otros modos de conseguir estos efectos, como es el caso de la proteína antitrombina de *Anopheles albimanus*, o las lipocalinas, inhibidores de la agregación de *Rhodnius prolixus*, que antagonizan el efecto del colágeno (Valenzuela y col., 2002b).

Los flebotomos poseen en la saliva **sustancias vasodilatadoras** que incrementan el flujo sanguíneo, antagonizando la vasoconstricción derivada de la respuesta hemostática consecuencia del daño tisular producido por las piezas bucales del insecto. Los vasodilatadores salivales pueden actuar, directa o indirectamente, sobre las células del músculo liso, activando enzimas intracelulares que finalmente desembocan en la producción de AMPc ó GMPc causando vasorrelajación. Los flebotomos del Nuevo Mundo (*Lutzomyia* spp.) poseen maxadilano, un potente vasodilatador, a diferencia de las especies del género *Phlebotomus* que carecen de él pero tienen adenosina y AMP que ejercen la función de vasodilatación (Valenzuela, 2002). El péptido sialokinina de *Aedes aegypti* actúa directamente sobre el endotelio, promoviendo la producción de óxido nítrico que a su vez activa la guanilato ciclasa, generándose finalmente un incremento de GMPc (Champagne y Ribeiro, 1994). Otra estrategia empleada por *Cimex lectularius* y *R. prolixus* es la liberación directa de óxido nítrico a través de proteínas portadoras o nitroforinas (Ribeiro, 1995). Existen otros mecanismos como la destrucción del potente vasoconstrictor, norepinefrina, mediante una peroxidasa de *An. albimanus* (Ribeiro y col., 1999) o la liberación de prostaglandinas por las garrapatas del género *Ixodes* (Ribeiro y Mather, 1998).

La cascada de la coagulación sanguínea concluye en la activación de la trombina, y transformación del fibrinógeno en fibrina que a su vez polimeriza para formar, junto con las plaquetas, el coágulo de sangre. Los **anticoagulantes** salivales bloquean este proceso a diferentes niveles de la cascada, mediante la ya citada anofelina de *An. albimanus* o inhibidores del factor Xa de tipo serpina en *Ae. aegypti*. En flebotomos, fundamentalmente encontramos apirinas, 5' nucleotidasas (Ribeiro, 1987; Ribeiro y Francischetti, 2003) o las proteínas recién descritas en *L. longipalpis*, lufaxina y lundep (Collin y col., 2012; Chagas y col., 2014).

La saliva también actúa a nivel de la **modulación del sistema inmune** en el lugar de la picadura, para lo que cuenta con componentes inmunosupresores que disminuyen la inflamación y la sensación de dolor en el hospedador (Ribeiro, 1987).

Generalmente los insectos hematófagos poseen más de una molécula que cumple con la misma función. La evolución de los insectos ha llevado a esta redundancia de moléculas con el objetivo final de asegurar el éxito de la alimentación sanguínea (Francischetti y col., 2005).

### **1.4.3 Composición de la saliva**

#### **1.4.3.1 Factores fisiológicos que determinan la composición de la saliva**

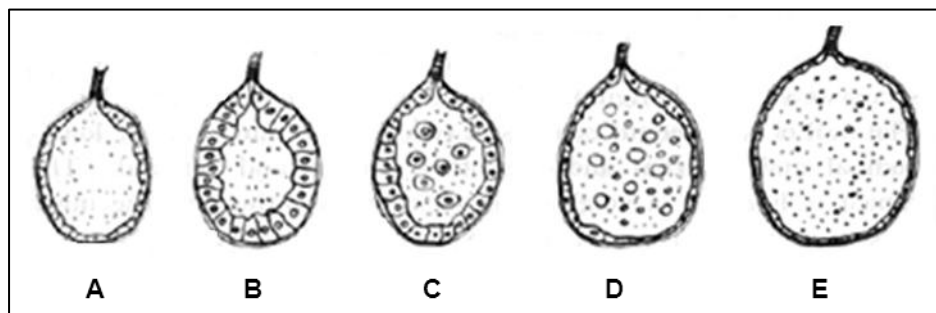
El contenido de las glándulas salivales varía en función de la edad, el sexo, el tipo de alimentación, la especie de flebotomo y factores ambientales. Incluso la adaptación al laboratorio de una colonia de flebotomos parece modificar la composición salival.

##### **- Alimentación y edad**

En flebotomos alimentados con azúcares, las glándulas van aumentando de tamaño con la edad considerándose maduras 3-5 días después de la emergencia del adulto (Adler y Theodor, 1926; Volf y col., 2000; Prates y col., 2008). Tras la alimentación con sangre, el contenido proteico de la saliva desciende drásticamente, hecho que confirma que la saliva es inyectada en el hospedador sobre el que se alimenta el flebotomo (Adler y Theodor, 1926). En *L. longipalpis* se ha cuantificado una disminución del contenido salival del 95% (Prates y col., 2008). Estos cambios a nivel proteico han sido confirmados a nivel de expresión génica en *P. papatasi* (Coutinho-Abreu y col., 2010). Inmediatamente después, las glándulas aparecen con un pequeño tamaño y recubiertas por una capa endotelial muy fina. Las células epiteliales van aumentando progresivamente de tamaño y llenándose de



gránulos. Tras un corto periodo de tiempo, comienzan a aparecer algunas células en el lumen de las glándulas, junto con pequeños gránulos secretados por las células del epitelio. Posteriormente, las células libres en el lumen degeneran y se lisan, liberando gránulos refractarios de mayor tamaño que aquellos liberados por las células epiteliales. A los tres o cuatro días de la emergencia o de la alimentación sanguínea, las glándulas aparecen distendidas repletas de gránulos secretados y productos de la degeneración de las células liberadas por el epitelio (Adler y Theodor, 1926). Dicho proceso se expone en la Figura 17.



**Figura 17. Glándulas salivales en varios estadios a lo largo del tiempo tras la alimentación con sangre (A-E). Fuente: Adler y Theodor (1926).**

#### **- Sexo**

La concentración proteica en el extracto salival de las hembras es 30 veces superior a la de los machos, que tienen un contenido mucho más pobre en proteínas (Volf y col., 2000).

#### **- Especie**

Se han encontrado diferencias en la composición proteica de la saliva entre especies, siendo estas muy marcadas entre los flebotomos del Viejo y Nuevo Mundo. En algunos casos estas diferencias en composición representan un reflejo de la distancia taxonómica (Volf y col., 2000; Anderson y col., 2006; Coutinho-Abreu y col., 2011). Se han documentado diferencias en la composición de la saliva a nivel intraespecífico, en poblaciones de flebotomos con distinto origen geográfico (Volf y col., 2000; Wahba y Riera, 2006). De forma similar, existen diferencias en la expresión del gen que codifica maxadillano en poblaciones de *L. longipalpis*. Estas diferencias se correlacionan con la gravedad de la sintomatología de la infección por *L. infantum*. Así, en Brasil y Colombia causa LV, mientras que en Costa Rica, Nicaragua y Honduras produce lesiones cutáneas atípicas (Warburg y col., 1994). También se han identificado diferencias en la composición a nivel individual en especímenes de *P. papatasi*, *P. sergenti* y *P. perniciosus* (Rohoušová y col., 2011b).

### **- Factores ambientales**

La adaptación de los organismos a las condiciones medioambientales está dirigida por una presión que provoca una fina modulación de la regulación génica, otorgando una plasticidad fenotípica cuyo objetivo final es mejorar la aptitud biológica o *fitness* (Gibson, 2008; Hodgins-Davis y Townsend, 2009). Los flebotomos también sufren este fenómeno de plasticidad genética. Concretamente, en *P. papatasi* se han descrito cambios en el rango de actividad de algunas enzimas, posiblemente implicadas en competencia vectorial (quitinasas y glicosidasas) entre ejemplares capturados en hábitats con abundancia o escasez de recursos azucarados (Jacobson y col., 2007).

La expresión de los genes que codifican las proteínas salivales en flebotomos parece estar modulada por las condiciones medioambientales (Coutinho-Abreu y col., 2010; Coutinho-Abreu y col., 2011; Coutinho-Abreu y Ramalho-Ortigao, 2011). Recientemente, en estudios de expresión génica, se ha detectado al final de la época de transmisión un incremento en la expresión para la mayoría de los genes salivales de *P. papatasi*, coincidiendo con una marcada limitación en la disponibilidad de alimentos azucarados debida a la sequía y a un aumento de casos de LC en la zona. Este hecho sugiere que la modulación de la composición de las proteínas salivales puede jugar un papel en la transmisión (Coutinho-Abreu y col., 2011). Además, es posible que la disponibilidad de la fuente de alimentación sanguínea pueda modular el patrón de expresión de genes salivales (Coutinho-Abreu y col., 2011). Sin embargo, se desconoce la implicación de la infección de *Leishmania* spp. sobre la expresión diferencial de las proteínas salivales de los flebotomos.

### **- Adaptación de los flebotomos al laboratorio**

La colonización de los flebotomos al laboratorio puede afectar a la composición de la saliva. En este contexto, se ha observado una mayor variabilidad genética en el gen PpSP15 en especímenes de *P. papatasi* recientemente capturados que en los procedentes de colonias mantenidas en el laboratorio (Elnaiem y col., 2005).

Además, las proteínas salivales de ejemplares de *L. longipalpis* capturados en el campo varían, cuantitativa y cualitativamente, en comparación con la saliva de especímenes originariamente procedentes del mismo lugar de captura, pero mantenidos en el laboratorio durante al menos 10 generaciones. Sorprendentemente, estos últimos muestran una mayor cantidad y variedad proteica. (Laurenti y col., 2009b). Estas variaciones podrían deberse a factores ambientales que afectan a la fuente de alimentación o a procesos de endogamia

durante el proceso de colonización y, por tanto, la disminución de variación genética (Coutinho-Abreu y col., 2011).

En cambio, otros autores no encontraron diferencias aparentes a nivel proteico entre especímenes de *P. papatasi* procedentes del campo y del laboratorio (Ben Hadj Ahmed y col., 2010).

#### **1.4.3.2 Composición de la saliva**

La saliva de los flebotomos, contenida en el lumen de las glándulas, consiste en una mezcla de sustancias de diversa naturaleza, fundamentalmente de origen proteico, con una gran proporción de glicoproteínas, además de purinas (Volf y col., 2000; Ribeiro y col., 2010). Muchas de estas proteínas únicamente se han identificado en la saliva de los insectos hematófagos y algunas de ellas presentan especificidad a nivel de género o subgénero.

##### **1.4.3.2.1 Enzimas**

###### **- Apirasas**

La apirasa parece ser la enzima universal utilizada para inhibir la coagulación de la sangre por diversos animales hematófagos, como sanguijuelas, garrapatas, triatominos, pulgas, culícidos y flebotomos. Esta enzima hidroliza el ATP y ADP liberados por las células de tejidos dañados y plaquetas, dando lugar a AMP y pirofosfato, e inhibe los efectos de estos nucleósidos implicados en la homeostasia y la inflamación. El ADP es un potente inductor de la agregación plaquetaria y el ATP promueve la liberación granulocítica de los neutrófilos, además de su agregación (Ribeiro y col., 2010).

Las apirasas de los insectos hematófagos se dividen en tres familias: CD-39 (superfamilia actina/choque térmico 70/azúcar quinasa); 5'-nucleotidasa, típicamente identificadas en culícidos y, por último, apirasas de tipo *Cimex*, cuya actividad es estrictamente dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , inicialmente descritas en *C. lectularius* (Hamasaki y col., 2009). En este último grupo se encuadran las apirasas descritas en flebotomos (Valenzuela y col., 1998; Charlab y col., 1999; Ribeiro y col., 2010). En *L. longipalpis* se ha identificado una enzima 5'-nucleotidasa que además de hidrolizar AMP también metaboliza UDP-glucosa, actuando por tanto como una fosfodiesterasa (Ribeiro y col., 2000b).

Se ha detectado actividad apirasa en la saliva de diversas especies de flebotomos (Ribeiro y col., 1989b; Charlab y col., 1999; Vlková y col., 2014) e incluso en proteínas recombinantes de *P. papatasi* producidas en un sistema procariota, lo que sugiere que las modificaciones postraduccionales no son esenciales para la actividad enzimática de esta proteína (Hamasaki y col., 2009).

En todas las especies de flebotomos estudiadas hasta el momento se han identificado transcritos que codifican apirasas (Charlab y col., 1999; Valenzuela y col., 2004; Anderson y col., 2006; Kato y col., 2006; Oliveira y col., 2006; Hostomská y col., 2009; Abdeladhim y col., 2012; Rohoušová y col., 2012; de Moura y col., 2013; Vlková y col., 2014). Adicionalmente, las apirasas también se encuentran a nivel proteico, constituyendo uno de los grupos proteicos mayoritarios en la saliva de los flebotomos, con un peso molecular de alrededor de 35 kDa (Anderson y col., 2006; Vlková y col., 2011; Rohoušová y col., 2012; Vlková y col., 2014).

Además de propiedades anticoagulantes, las apirasas también poseen propiedades antigénicas. Estas proteínas son reconocidas por los sueros de animales experimentalmente expuestos a las picaduras de los flebotomos (Rohoušová y col., 2005a; Giunchetti y col., 2008; Hostomská y col., 2008; Drahota y col., 2009; Hamasaki y col., 2009; Hostomská y col., 2009; Teixeira y col., 2010; Vlková y col., 2011; Vlková y col., 2012; Vlková y col., 2014), y por sueros de humanos y de perros residentes en zonas endémicas (Rohoušová y col., 2005a; Teixeira y col., 2010; Marzouki y col., 2011; Vlková y col., 2011).

#### **- Hialuronidasas**

La enzima hialuronidasa cataliza la hidrólisis del ácido hialurónico, componente mayoritario de la matriz extracelular en vertebrados. Se ha sugerido que juega un papel importante en la reducción de la viscosidad del tejido de la piel en las proximidades de la picadura, favoreciendo la difusión de otros componentes de la saliva y la ingestión de sangre (Ribeiro y col., 2010). Esta enzima ha sido fundamentalmente detectada en insectos telmofágicos, hecho que apoya su importancia en la formación de hematomas sanguíneos (Ribeiro y col., 2000a; Volfova y col., 2008).

La hialuronidasa es una enzima ubicua, ampliamente distribuida en mamíferos, bacterias e incluso en el veneno de insectos y serpientes (Stern y Jedrzejewski, 2006). A pesar de que se ha detectado una elevada actividad de esta enzima en todas las especies de flebotomos estudiadas hasta el momento (Charlab y col., 1999; Ribeiro y col., 2000a; Cerna y col., 2002; Volfova y col., 2008; Hostomská y col., 2009; Vlková y col., 2014), no se

encuentra fácilmente a nivel transcriptómico ni proteómico. La escasa abundancia de transcritos en combinación con el gran tamaño que presenta la proteína dificulta su identificación (Rohoušová y col., 2012).

La potente actividad de la hialuronidasa parece intervenir en la diseminación de los microorganismos transmitidos. De hecho, se ha demostrado la exacerbación de lesiones en ratones BALB/c tras la inoculación de promastigotes de *L. major* en presencia de hialuronidasa exógena (Volfova y col., 2008).

Esta enzima podría ser en parte responsable de las propiedades alergénicas de la saliva de los flebotomos ya que, aunque esta hipótesis está sin confirmar, las hialuronidasas de otros insectos hematófagos sí han sido involucradas como alérgenos (King y col., 1996; Wilson y col., 2008).

### **- Endonucleasa**

Las endonucleasas son enzimas que hidrolizan enlaces fosfodiéster sobre una cadena nucleotídica, liberando nucleósidos. Se han identificado transcritos codificantes de endonucleasas en la saliva de algunos culícidos (*Culex quinquefasciatus* y *Ochlerotatus triseriatus*) y simúlidos (Ribeiro y col., 2010). En flebotomos se han encontrado en la saliva de *P. arabicus*, *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *Phlebotomus orientalis*, *P. argentipes*, *L. longipalpis* y *Lutzomyia ayacuchensis* (Hostomská y col., 2009; Kato y col., 2012; Vlková y col., 2014).

La actividad de esta enzima, al igual que la hialuronidasa, parece estar relacionada con la reducción de la viscosidad del tejido cercano a la picadura y con la diseminación del parásito (Calvo y Ribeiro, 2006; Chagas y col., 2014). Los nucleósidos liberados en la reacción poseen efectos sobre la respuesta homeostática e inmune del hospedador, fundamentalmente adenosina (Hostomská y col., 2009).

La endonucleasa presente en la saliva de *L. longipalpis*, recientemente denominada Lundep, inhibe la coagulación sanguínea por interferencia con la activación del factor XIIa, debido a su actividad DNasa. También favorece la alimentación sanguínea en modelos *in vivo* (Chagas y col., 2014). La endonucleasa de esta misma especie es reconocida por sueros de perros expuestos a estos flebotomos de forma natural y experimental (Teixeira y col., 2010).

### **- Adenosina deaminasa (ADA)**

Esta enzima convierte la adenosina, molécula vasodilatadora, antiagregante plaquetaria e inmunosupresora, en inosina, metabolito que también presenta propiedades antiinflamatorias y antihemostáticas, pero con actividad vasodilatadora menor. La adenosina, además de intervenir en la hemostasia, es un agente implicado en la reducción de la sensación de dolor, atenuando la percepción del hospedador a la picadura (Charlab y col., 2000).

La proteína ADA fue inicialmente descrita en la saliva de *L. longipalpis* (Charlab y col., 2000) y posteriormente en *Lutzomyia intermedia* (de Moura y col., 2013). Sorprendentemente, tanto la actividad enzimática como los transcritos que codifican esta enzima están ausentes en la saliva de *P. argentipes*, *P. papatasi*, *P. orientalis*, *P. ariasi* y *P. perniciosus* (Charlab y col., 2000; Anderson y col., 2006; Vlková y col., 2014) lo que llevó a pensar que esta enzima era específica de los flebotomos del Nuevo Mundo. Sin embargo, posteriores estudios con *P. duboscqi*, pusieron de manifiesto la actividad de ADA en su saliva (Kato y col., 2006). Asimismo, la proteína recombinante procedente de un transcrito aislado de una genoteca de las glándulas salivales de *P. duboscqi* también presenta dicha actividad (Kato y col., 2007).

Por otro lado, la actividad enzimática de ADA disminuye drásticamente tras la alimentación sanguínea, confirmando su expulsión en la saliva inoculada (Charlab y col., 2000; Kato y col., 2007). Su actividad también ha sido detectada en culícidos (Ribeiro y col., 2001).

### **- Otras enzimas**

La **fosfolipasa A2** (PLA2) es el alérgeno mayoritario en venenos de himenópteros, cuyo dominio PLA2 ha sido descrito en transcritos identificados en la saliva de *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. orientalis* y *P. arabicus* (Anderson y col., 2006; Oliveira y col., 2006; Hostomská y col., 2009; Vlková y col., 2014).

Las enzimas **pirofosfatasa** o **fosfodiesterasas** se han identificado en la saliva del género *Phlebotomus*, en el Viejo Mundo (Anderson y col., 2006; Kato y col., 2006; Hostomská y col., 2009; Vlková y col., 2014). Podrían ser responsables de la hidrólisis de nucleótidos que actúan como mediadores inflamatorios (Hostomská y col., 2009), función que en *L. longipalpis* podría atribuirse a la 5' nucleotidasa/fosfodiesterasa, lo que sería un

ejemplo de evolución convergente entre los diversos mecanismos hemofágicos en flebotomos (Ribeiro y col., 2000b).

Las **glicosidasas** son enzimas relacionadas con el metabolismo de azúcares y están ampliamente distribuidas en todos los nematódicos. Su actividad ha sido demostrada en la saliva, tanto de machos como de hembras. La amilasa interviene en la digestión del almidón y ha sido descrita en la saliva de *P. arabicus*, *P. orientalis* y *L. longipalpis*, además de en el tubo digestivo de *P. papatasi* y *L. longipalpis* (Charlab y col., 1999; Ramalho-Ortigao y col., 2007; Jochim y col., 2008; Hostomská y col., 2009; Vlková y col., 2014). La trehalasa escinde la trehalosa, fuente de energía mayoritaria en la hemolinfa de insectos, en glucosa disponible para las células. Se ha descrito en la saliva de *P. arabicus* y en el tubo digestivo de *P. papatasi* (Ramalho-Ortigao y col., 2007; Hostomská y col., 2009).

#### **1.4.3.2.2 Otras proteínas**

##### **- Proteínas amarillas**

Esta familia de proteínas se encuentra fundamentalmente en la saliva de los insectos y en algunas bacterias y hongos. Debe su nombre a observaciones realizadas en *Drosophila melanogaster*, donde la mutación de un gen dio lugar a un fenotipo amarillo, indicando la interrupción de los procesos de melanización y pigmentación de la cutícula (Geyer y col., 1986). La proteína mayoritaria de la jalea real de las abejas también forma parte de esta familia (Schmitzova y col., 1998; Albert y col., 1999).

En los flebotomos las proteínas amarillas están presentes a nivel transcriptómico y proteómico en elevadas proporciones, con un peso molecular de alrededor de 41-45 kDa y un amplio rango de punto isoelectrónico (pI) (Anderson y col., 2006; Hostomská y col., 2009; Ribeiro y col., 2010; Rohoušová y col., 2012; Vlková y col., 2014). También se han detectado proteínas amarillas en el estómago de los flebotomos, sin embargo, se piensa que proceden de su propia saliva ingerida (Volf y col., 2002).

La función de las proteínas amarillas no ha sido totalmente esclarecida. En *Drosophila* y culícidos están implicadas en procesos de melanización (Fang y col., 2002; Han y col., 2002). En flebotomos, recientemente se ha confirmado que actúan uniéndose a ciertas aminas biogénicas, como la serotonina, norepinefrina, epinefrina e histamina, anulando por tanto los efectos que estas producen (vasoconstricción, activación plaquetaria, aumento de la permeabilidad vascular, picor y dolor). La eliminación de estas sustancias y la

variación en la concentración de proteínas amarillas parecen estar relacionadas estequiométricamente (Xu y col., 2011).

Las proteínas amarillas poseen propiedades antigénicas ya que son reconocidas por el suero de animales expuestos a las picaduras de los flebotomos, tanto de forma experimental como natural (Gomes y col., 2002; Rohoušová y col., 2005a; Silva y col., 2005; Bahia y col., 2007; Giunchetti y col., 2008; Hostomská y col., 2008; Drahota y col., 2009; Hostomská y col., 2009; Souza y col., 2010; Teixeira y col., 2010; Marzouki y col., 2011; Vlková y col., 2011; Vlková y col., 2012; Vlková y col., 2014). Además, están siendo evaluadas como candidatos vacunales frente a la leishmaniosis (Apartado 1.4.4.2).

#### **- Maxadilano**

El maxadilano es un péptido de pequeño tamaño (6´5 kDa) que constituye una de las moléculas más importantes en la saliva de *L. longipalpis*. Tras la picadura de este insecto aparece rápidamente un eritema, no asociado con edema o picor, atribuido al maxadilano y que puede persistir durante 48 horas (Ribeiro y col., 1989a). Presenta una actividad vasodilatadora 500 veces superior al péptido más potente conocido hasta su descubrimiento (Lerner y col., 1991). Este efecto se debe a su papel como agonista de receptores PAC1 (Moro y Lerner, 1997), activando la adenilato ciclasa y produciendo vasodilatación vía AMPc. Además de los efectos vasodilatadores, el maxadilano posee propiedades inmunomoduladoras, tales como la inhibición de la proliferación de células T y de las reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH) (Qureshi y col., 1996). Otros autores han demostrado que el maxadilano reduce la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos y regula positivamente la producción de citoquinas asociadas con una respuesta inmune de tipo Th2 (Soares y col., 1998; Brodie y col., 2007).

Debido a sus propiedades antihemostáticas e inmunomoduladoras, este péptido juega un papel importante en el establecimiento de la infección del parásito, facilitando la transmisión, por lo que se ha estudiado su uso como potencial vacuna anti-*Leishmania* (Morris y col., 2001). Este aspecto se describe en mayor profundidad en el Apartado 1.4.4.2.

El maxadilano representa el 1-2% del contenido proteico de las glándulas salivales de *L. longipalpis* (Lerner y col., 1991) y únicamente se ha identificado en algunas especies de este género como *L. intermedia* (de Moura y col., 2013). La ausencia de este vasodilatador en la saliva de los flebotomos del Viejo Mundo (*Phlebotomus* spp.) marca una diferencia fundamental en los mecanismos de ingestión sanguínea entre ambos géneros. Además, también se han encontrado notables diferencias cuantitativas y cualitativas en la



saliva de diversas poblaciones de *L. longipalpis*. Concretamente, la saliva de *L. longipalpis* procedente de Costa Rica posee concentraciones de maxadilano relativamente bajas en comparación con ejemplares de Brasil o Colombia (Warburg y col., 1994). Se ha identificado un elevado nivel de polimorfismo en las secuencias de maxadilano, tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico, entre distintas razas de *L. longipalpis* (Lanzaro y col., 1999). Las zonas variables del maxadilano parecen estar involucradas en la unión a las inmunoglobulinas, tratándose por tanto de las zonas responsables de la antigenicidad (Milleron y col., 2004a). Las diferentes variantes de maxadilano podrían haber surgido como una estrategia de evasión de la respuesta inmune del hospedador (Milleron y col., 2004a).

#### **- Lufaxina**

Esta proteína, recientemente descrita en *L. longipalpis*, ha demostrado actuar como un potente anticoagulante. Su actividad se debe a la inhibición específica del factor de coagulación Xa, elemento clave en la cascada de coagulación (Collin y col., 2012). Además, este factor también actúa como molécula proinflamatoria, a nivel de receptores de proteasa activados (PAR) en células endoteliales, e hiperalgesia (Rothmeier y Ruf, 2012).

Inicialmente denominadas como proteínas de 33 kDa de función desconocida (Anderson y col., 2006), estas moléculas han sido recientemente relacionadas con proteínas similares a lufaxina tras su descripción en *L. longipalpis* (*Lutzomyia longipalpis* Factor Xa inhibitor) (Collin y col., 2012).

Estas proteínas alcalinas, de peso molecular en torno a 32-36 kDa parecen ser específicas de flebotomos y han sido descritas en especies de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Anderson y col., 2006; Ribeiro y col., 2010; Abdeladhim y col., 2012; Collin y col., 2012; Rohoušová y col., 2012; de Moura y col., 2013; Vlková y col., 2014).

Las proteínas similares a lufaxina presentes en *P. perniciosus* (SP06, GenBank: ABA43054) y en *L. longipalpis* (LJL143, GenBank: AAS05319), fueron reconocidas por los sueros de perros residentes en zonas endémicas (Teixeira y col., 2010; Vlková y col., 2011).

#### **- Superfamilia de proteínas de unión a sustancias olorosas (OBP)/D7**

En flebotomos existen dos grupos de proteínas encuadradas en esta superfamilia de proteínas de unión a sustancias olorosas; las proteínas relacionadas con D7 y las proteínas

similares a PpSP15. Estas proteínas poseen un plegamiento estructural característico que les permite unirse a ligandos de pequeño tamaño (Valenzuela y col., 2002a).

➤ **Proteínas relacionadas con D7.** Ampliamente distribuidas en la saliva de los dípteros hematófagos. Una de las primeras proteínas clonadas a partir de la saliva de *Ae. aegypti* fue denominada arbitrariamente D7 (James y col., 1991). A partir de entonces se han ido identificando proteínas similares en la saliva de otros nematóceros como culícidos, simúlidos, culicoides y flebotomos (Valenzuela y col., 2002a). En estudios más exhaustivos realizados con culícidos se descubrió que estas proteínas pertenecían a la superfamilia de las OBP o feromonas. Presentan una organización multigénica que, debido a procesos de duplicación génica, se han diferenciado en dos formas de proteínas denominadas formas largas y cortas (Arcà y col., 2002). En flebotomos las proteínas D7 descritas se relacionan con la forma larga (Charlab y col., 1999).

En los culícidos, las proteínas D7 son capaces de unirse a aminas biogénicas y leucotrienos, además de a varios componentes de la cascada de coagulación, interfiriendo en la respuesta homeostática e inmune del hospedador (Calvo y col., 2006; Isawa y col., 2007). El papel que juegan en los flebotomos aún no ha sido esclarecido.

Algunos autores han puesto de manifiesto la antigenicidad de las proteínas relacionadas con D7. Sueros de vertebrados, natural y experimentalmente expuestos a las picaduras, reconocieron estas proteínas (Rohoušová y col., 2005a; Bahia y col., 2007; Hostomská y col., 2008; Drahota y col., 2009; Teixeira y col., 2010; Marzouki y col., 2011; Vlková y col., 2011; Vlková y col., 2012; Vlková y col., 2014).

➤ **Proteínas relacionadas con PpSP15.** Únicamente descritas en los flebotomos, representan el grupo mayoritario en las glándulas salivales a nivel transcriptómico (Hostomská y col., 2008; Rohoušová y col., 2012; Vlková y col., 2014). Las secuencias de estas proteínas muestran un elevado grado de variabilidad además de ciertos residuos de cisteína conservados (Abdeladhim y col., 2012; Vlková y col., 2014). Deben su nombre a la proteína de 15 kDa descrita en *P. papatasi* como candidato vacunal frente a la infección por *L. major* (Valenzuela y col., 2001a). Sin embargo, la proteína SL1 de *L. longipalpis* no promueve una inmunidad celular en modelos animales (Gomes y col., 2008; Collin y col., 2009; Xu y col., 2011). Las proteínas relacionadas con PpSP15 poseen un peso molecular teórico de entre 12 y 17 kDa y un amplio rango de pI. Tal es la variabilidad que en *P. papatasi* han sido recientemente clasificadas en tres subgrupos, de acuerdo a su tamaño (proteínas relacionadas con PpSP12, PpSP14 y PpSP15) (Kato y col.,

2006; Abdeladhim y col., 2012). Recientemente, se ha demostrado que proteínas SP15 de *P. duboscqi* (PdSP15a y PdSP15b) son capaces de inhibir la cascada de la coagulación por la competición con el factor XII por los sitios de unión a la heparina, polifosfatos y dextranos (Alvarenga y col., 2013).

Las proteínas salivales de alrededor de 15 kDa son reconocidas por los sueros de animales y humanos expuestos a la saliva de flebotomos (Barral y col., 2000; Valenzuela y col., 2001a; Silva y col., 2005; Drahota y col., 2009; Teixeira y col., 2010; Marzouki y col., 2011; Vlková y col., 2011; Vlková y col., 2012; Vlková y col., 2014).

#### **- Proteínas relacionadas con el antígeno 5 (Ag5)**

Estas proteínas pertenecen a la superfamilia CAP, proteínas ricas en residuos de cisteína asociadas tanto con mecanismos de defensa en plantas y animales como con toxinas en el veneno de reptiles (Ribeiro y col., 2010). Están ampliamente distribuidas en la saliva de flebotomos.

Son proteínas alcalinas de unos 30 kDa de función desconocida en la mayoría de los casos. Investigaciones recientes sugieren que estas proteínas intervienen en la hemostasia y respuesta inmune del hospedador. Concretamente, una proteína perteneciente a esta familia, presente en la saliva de la mosca *Stomoxys calcitrans*, es capaz de unirse a las regiones Fc de las inmunoglobulinas (Ameri y col., 2008) y podría por tanto actuar inhibiendo el complemento por la vía clásica (Wang y col., 2009). En el tabánido *Tabanus yao* se ha descrito una proteína Ag5 responsable de la inhibición de la agregación plaquetaria (Xu y col., 2008).

En otros dípteros hematófagos, las proteínas Ag5 parecen ser responsables de alergias a las picaduras ya que se han asociado con una respuesta de anticuerpos de tipo IgE (Caljon y col., 2009; Schaffartzik y col., 2009). Además, también se han descrito respuestas de tipo IgG frente a estas proteínas en animales expuestos a las picaduras de *P. perniciosus*, *Phlebotomus tobbi*, *P. orientalis* y *P. papatasi*, respectivamente (Vlková y col., 2011; Rohoušová y col., 2012; Vlková y col., 2012; Vlková y col., 2014).

#### **- Proteínas relacionadas con ParSP25**

Esas proteínas presentan un tamaño de alrededor de 25 kDa y un pI de 4'4-5, debido a la gran proporción de residuos ácidos encontrados en regiones conservadas. Esta familia de proteínas parece ser específica de los flebotomos, incluso a nivel del género

*Phlebotomus*, pues únicamente se han identificado en especies de los subgéneros *Adlerius* (*P. arabicus*), *Larroussius* (*P. ariasi*, *P. perniciosus* y *P. tobbi*) y *Phlebotomus* (*P. papatasi*) (Anderson y col., 2006; Oliveira y col., 2006; Hostomská y col., 2009; Abdeladhim y col., 2012; Rohoušová y col., 2012). Se desconoce su función, aunque algunos miembros de esta familia son altamente inmunogénicos. Concretamente, la proteína SP08 de *P. perniciosus* es reconocida por el suero de perros expuestos a la saliva de este vector (Vlková y col., 2011). ParSP25 de *P. ariasi* promueve en ratones una respuesta humoral, en animales inmunizados con el plásmido codificante de dicha proteína, y celular, de tipo de hipersensibilidad retardada (DTH) (Oliveira y col., 2006).

#### **- Proteínas similares a PpSP32**

Esta familia de proteínas, inicialmente descritas en *P. papatasi* (Valenzuela y col., 2004), sólo ha sido identificada en flebotomos. Hasta la fecha, se ha encontrado en todas las especies de flebotomos estudiadas. Presentan un peso molecular teórico que oscila entre 22 y 35 kDa y un pI muy alcalino. Las secuencias de estas proteínas poseen regiones muy conservadas en N y C terminal, contrariamente a las zonas internas de la secuencia que se muestran altamente variables (Rohoušová y col., 2012).

Se desconoce la función de estas proteínas, aunque, se ha sugerido que puedan actuar a nivel de unión al colágeno, ya que se han detectado motivos de unión en *P. perniciosus* y *L. longipalpis* (Valenzuela y col., 2004; Anderson y col., 2006). PpSP32 es el antígeno dominante en la respuesta humoral de humanos en una zona endémica de LC zoonótica de Túnez (Marzouki y col., 2012) y también fue reconocido por sueros de ratones expuestos a las picaduras de *P. papatasi* (Vlková y col., 2012). La inmunogenicidad de las proteínas similares a PpSP32 posiblemente esté asociada con su elevado nivel de glicosilación (Vlková y col., 2014), ya que la proteína recombinante PpSP32 producida en un sistema de expresión eucariota conservó su inmunogenicidad (Marzouki y col., 2012), no siendo así para una proteína similar a PpSP32 de *L. longipalpis* expresada en un sistema procariota (Xu y col., 2011).

#### **- Superfamilia de 41´9 kDa**

Se han identificado proteínas pertenecientes a esta superfamilia en la saliva de culícidos, simúlidos, culicoides y flebotomos (Ribeiro y col., 2010). Estas proteínas, de tipo mucina, poseen multitud de sitios potenciales de N-glicosilación y en flebotomos presentan un peso molecular y un pI variables (Rohoušová y col., 2012).

En las glándulas salivales de *P. papatasi* se ha identificado recientemente un transcrito que codifica una proteína de 50´1 kDa (Abdeladhim y col., 2012) con elevada similitud con la secuencia de proteínas pertenecientes a esta superfamilia. Aunque dicha proteína ha sido encuadrada en una familia denominada SP56´6 seguramente se trate de la misma familia de proteínas.

#### **- Familia de proteínas de 2´5 kDa**

La familia de 2´5 kDa está compuesta por las proteínas de menor peso molecular descritas en flebotomos. Únicamente se han detectado de forma minoritaria a nivel transcriptómico y se desconoce su función. Se han identificado transcritos con cierta similitud, aunque con homologías no significativas, en algunas especies del subgénero *Larrousius* y *Adlerius* (Hostomská y col., 2009; Abdeladhim y col., 2012).

#### **- Péptidos que contienen el motivo RGD**

El motivo RGD (Arg-Gly-Asp) interviene en la unión de integrinas y se ha especulado que las proteínas de la saliva que contienen este motivo en la región C-terminal podrían actuar como inhibidores de la agregación plaquetaria (Charlab y col., 1999). En la saliva de *L. ayacuchensis* la mayoría de los transcritos identificados corresponden a este grupo (Kato y col., 2012). También han sido identificados en *L. longipalpis* y *L. intermedia* (Charlab y col., 1999; de Moura y col., 2013).

Por último, se han detectado diversos transcritos codificantes de proteínas de alrededor de 16 kDa en la saliva de *L. longipalpis* y *L. ayacuchensis*. Poseen un **dominio lectina tipo C**, que podría intervenir en procesos de interacciones celulares o incluso como anticoagulantes, por homología con sustancias que realizan esta misma función (Charlab y col., 1999; Kato y col., 2012).

Además, en la saliva de *L. intermedia* se han identificado proteínas similares a **toxinas** (de Moura y col., 2013).

#### **1.4.3.2.3 Nucleósidos**

*P. papatasi* y *P. argentipes* contienen AMP y adenosina en sus glándulas salivales que actúan como potentes vasodilatadores, inhibidores de la agregación plaquetaria e inmunomoduladores (Ribeiro y col., 1999; Ribeiro y Modi, 2001). Estas sustancias están ausentes en la saliva de los flebotomos del Nuevo Mundo, ya que la función vasodilatadora

recae fundamentalmente sobre el potente maxadilano. Curiosamente, como fruto de la diferente evolución de las estrategias salivales, *P. duboscqi* no contiene ni AMP ni adenosina en su saliva, pero consigue mantener niveles de vasodilatación aptos para la hematofagia gracias a la enzima adenosina deaminasa (Kato y col., 2007).

#### **1.4.3.3 Proteínas salivales de *P. perniciosus***

Se han descrito 20 proteínas en la saliva de *P. perniciosus*, mediante el análisis de una genoteca de ADNc de las glándulas salivales de especímenes procedentes de una colonia de flebotomos establecida con especímenes capturados en Italia (Anderson 2006). Las características de estas proteínas se describen a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas salivales de *P. perniciosus* (Anderson y col., 2006).

Nombre	Nucleótido		CDS		Proteína				
	GenBank	pb	Localización	pb	GenBank	Aminoácidos	kDa	pI	Familia
SP01	<a href="#">DQ192490.1</a>	1097	30-1028	999	<a href="#">ABB00906.1</a>	332	35´5	9´3	Apirasa
SP01B	<a href="#">DQ192491.1</a>	1143	49-1047	999	<a href="#">ABB00907.1</a>	332	35´3	8´82	Apirasa
SP02	<a href="#">DQ150620.1</a>	1471	26-451	426	<a href="#">ABA43048.1</a>	141	14´8	8´7	Relacionada con PpSP15
SP03	<a href="#">DQ150621.1</a>	1273	5-1171	1167	<a href="#">ABA43049.1</a>	388	42	6´0	Proteínas amarillas
SP03B	<a href="#">DQ150622.1</a>	1341	46-1227	1182	<a href="#">ABA43050.1</a>	393	43	8´6	Proteínas amarillas
SP04	<a href="#">DQ150623.1</a>	839	20-781	762	<a href="#">ABA43051.1</a>	253	24´5	8´5	Relacionada con D7
SP04B	<a href="#">DQ150624.1</a>	860	47-805	759	<a href="#">ABA43052.1</a>	252	27	8´7	Relacionada con D7
SP05	<a href="#">DQ153099.1</a>	947	24-845	822	<a href="#">ABA43053.1</a>	273	28	10´4	Relacionada con PpSP32
SP06	<a href="#">DQ153100.1</a>	1062	44-976	933	<a href="#">ABA43054.1</a>	310	33	8´9	Similar a lufaxina
SP07	<a href="#">DQ153101.1</a>	1035	66-881	816	<a href="#">ABA43055.1</a>	271	30	9´3	Proteínas relacionadas con el antígeno 5
SP08	<a href="#">DQ153102.1</a>	934	73-846	774	<a href="#">ABA43056.1</a>	257	29	4´9	Relacionada con ParSP25kDa
SP09	<a href="#">DQ153103.1</a>	500	5-430	426	<a href="#">ABA43057.1</a>	141	14,6	8´6	Relacionada con PpSP15
SP10	<a href="#">DQ153104.1</a>	952	43-792	750	<a href="#">ABA43058.1</a>	249	27	9´4	Desconocida
SP11	<a href="#">DQ153105.1</a>	499	16-411	396	<a href="#">ABA43059.1</a>	131	13	9´0	Relacionada con SL1 ( <i>L. longipalpis</i> )
SP12	<a href="#">DQ153106.1</a>	379	21-269	249	<a href="#">ABA43060.1</a>	82	7	11´0	Desconocida
SP13	<a href="#">DQ153107.1</a>	425	17-310	294	<a href="#">ABA43061.1</a>	97	10	4´8	Endonucleasa
SP15	<a href="#">DQ192489.1</a>	522	30-179	150	<a href="#">ABB00905.1</a>	49	2,7	10´6	Desconocida
SP18	<a href="#">DQ154097.1</a>	1613	584-1465	882	<a href="#">ABA43062.1</a>	293	30	8´3	Fosfolipasa A2
SP19	<a href="#">DQ154098.1</a>	1471	55-1350	1296	<a href="#">ABA43063.1</a>	431	46	8´5	Superfamilia 41´9 kDa
SP32	<a href="#">DQ154099.1</a>	1772	29-1195	1167	<a href="#">ABA43064.1</a>	388	41	9´5	Endonucleasa

#### 1.4.4 Inmunología de la saliva

No es sorprendente que la saliva de los artrópodos hematófagos, al estar compuesta por una elevada cantidad de proteínas de diversa naturaleza, posea propiedades inmunogénicas e inmunomoduladoras sobre los hospedadores vertebrados. Estas interacciones saliva-hospedador no son iguales para todos los artrópodos y están altamente relacionadas con los mecanismos y la duración de la hematofagia. Concretamente, en el caso de algunas garrapatas, al permanecer sobre el hospedador durante prolongados periodos de tiempo, la combinación de la respuesta inmune humoral y celular del hospedador a las proteínas salivales puede mediar el fenómeno de rechazo de la garrapata, circunstancia que va en detrimento del éxito en la alimentación sanguínea. Sin embargo, en el caso de los flebotomos, la interacción con el hospedador es mucho más breve y la respuesta inmune frente a la saliva puede incluso representar una ventaja para el flebotomo, favoreciendo la succión de la sangre (Belkaid y col., 2000).

La saliva de los flebotomos desencadena en el hospedador una **respuesta inmune humoral** con producción de anticuerpos específicos frente a las proteínas de la saliva (Figura 18). Esta respuesta de anticuerpos de tipo IgG ha sido detectada tanto en situaciones de exposición experimental a la saliva de los flebotomos (Belkaid y col., 1998; Ghosh y Mukhopadhyay, 1998; Valenzuela y col., 2001a; Volf y Rohoušová, 2001; Rohoušová y col., 2005a; Silva y col., 2005; Vinhas y col., 2007; Hostomská y col., 2008; Vlková y col., 2011; Vlková y col., 2012; Vlková y col., 2014) como en hospedadores residentes en zonas endémicas (Barral y col., 2000; Paranhos-Silva y col., 2003; Rohoušová y col., 2005a; Bahia y col., 2007; Gomes y col., 2007; Souza y col., 2010; Teixeira y col., 2010; Vlková y col., 2011; Geraci y col., 2014).

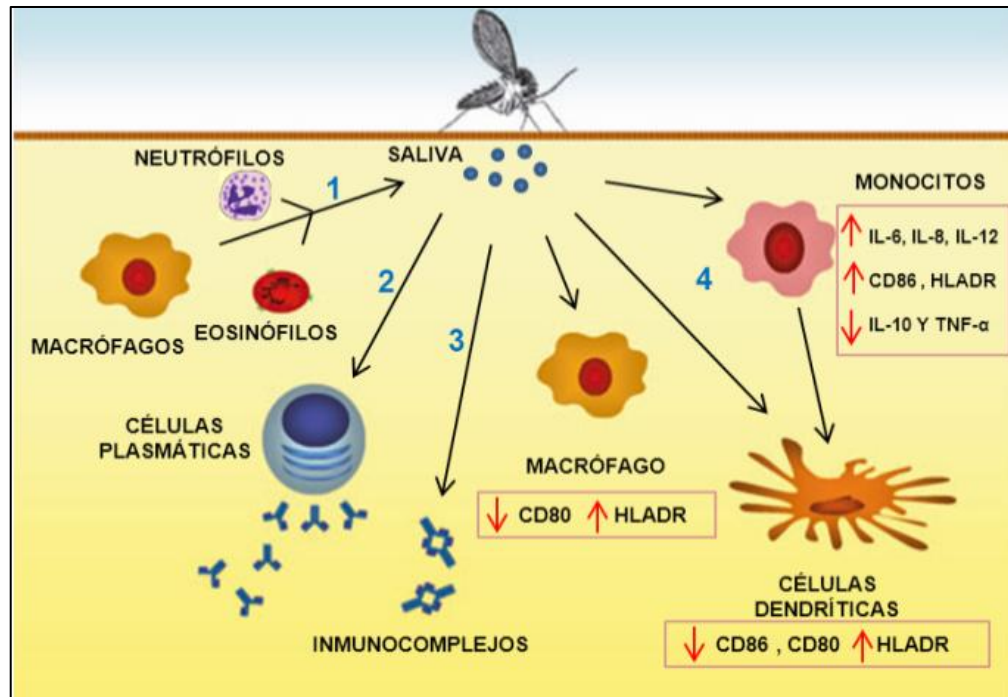
El desarrollo de una respuesta humoral frente a la saliva de los flebotomos se ha asociado con la aparición de la respuesta celular frente al antígeno de *Leishmania* (Barral y col., 2000; Aquino y col., 2010), procesos que parecen ocurrir de forma simultánea (Gomes y col., 2002).

La saliva produce una **respuesta inmune celular** de hipersensibilidad retardada (DTH), caracterizada por la infiltración de células proinflamatorias (neutrófilos, eosinófilos y macrófagos) en el lugar de la picadura, que puede persistir hasta 48 h (Belkaid y col., 1998; Silva y col., 2005; Vasconcelos y col., 2014).



Tras el procesamiento antigénico de las proteínas salivales en las células dendríticas de la piel, se produce la activación y expansión clonal de células T que, tras un nuevo contacto con el antígeno, se congregan en la zona de la picadura, donde comienzan a secretar citoquinas proinflamatorias (Ribeiro y Francischetti, 2003) (Figura 18). Esta potente respuesta celular es conocida tradicionalmente en Oriente Medio como “harara” en referencia a los efectos producidos por la picadura de *P. papatasi* sobre la piel humana (Theodos, 1935). En ratones previamente sensibilizados con la saliva de *P. papatasi*, un nuevo contacto con ésta causa infiltración celular compuesta mayoritariamente por linfocitos CD4+, monocitos/macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Belkaid y col., 1998; Belkaid y col., 2000). En *P. duboscqi*, la caracterización del reclutamiento celular en el lugar de la picadura en ratones previamente expuestos a sus picaduras ha destacado también la presencia de células NK y monocitos Gr<sup>+</sup> (células productoras de Granzima B) (Teixeira y col., 2014). En experimentos *in vitro* se han demostrado las propiedades quimioatrayentes de la saliva de *Phlebotomus* spp. sobre monocitos de ratón (Anjili y col., 1995; Zer y col., 2001).

Paradójicamente, los flebotomos aprovechan esta respuesta inmune del hospedador para alimentarse de él más rápidamente, ya que el flujo sanguíneo es mayor en lugares de la piel que presentan una respuesta DTH (Belkaid y col., 2000). Únicamente algunas de las moléculas de la saliva son responsables de la inducción de la respuesta DTH y, además, la respuesta producida por esas moléculas se rige por factores genéticos del hospedador (Belkaid y col., 2000; Valenzuela y col., 2001a; Oliveira y col., 2006). En estudios recientes en Mali, se ha observado que individuos procedentes de una zona endémica de LC desarrollan diferentes patrones de respuesta celular (Th1, Th2 o respuesta mixta Th1/Th2) frente a la saliva de *P. duboscqi* (Oliveira y col., 2012).



**Figura 18.** Efectos de la saliva de *L. longipalpis* sobre el sistema inmune del hospedador vertebrado. 1) Infiltración de células inflamatorias hacia el lugar de la picadura. 2) Producción de anticuerpos frente a las proteínas salivales. 3) Formación de inmunocomplejos en la fase temprana, tras la picadura. 4) Modulación de la liberación de citoquinas y producción de moléculas coestimuladoras por las células presentadoras de antígeno. Fuente: Imagen modificada de Andrade y col. (2007).

#### 1.4.4.1 Implicación de la saliva en el establecimiento de la infección por *Leishmania* spp.

A veces los microorganismos transmitidos por vectores pueden alojarse en las glándulas salivales y, por tanto, la vía de acceso al hospedador vertebrado tiene lugar a través del conducto salival (*Plasmodium* spp, *Trypanosoma brucei*, diversos arbovirus y especies de *Borrelia* y *Rickettsia*). La saliva juega en estos casos un papel crucial, ya que los patógenos son inoculados embebidos en ella (Krenn y Aspöck, 2012). Por el contrario, en el caso de *Leishmania* los parásitos proceden del tubo digestivo y son depositados en un lugar de la piel sustancialmente modificado por la saliva del vector (Ribeiro, 1995).

En un primer contacto, la saliva de los flebotomos favorece el establecimiento y progreso de la infección de *Leishmania* spp. Esta hipótesis fue inicialmente planteada por Titus y Ribeiro en 1988 al demostrar que la inoculación de extracto salival de *L. longipalpis*, junto con promastigotes de *L. major*, aumentaba significativamente la carga parasitaria y exacerbaba las lesiones en ratones (Titus y Ribeiro, 1988). Posteriormente, estas observaciones se han confirmado con otras especies de *Leishmania* (Titus y Ribeiro, 1988; Samuelson y col., 1991; Theodos y col., 1991; Warburg y col., 1994; Lima y Titus, 1996).

El efecto más notable de la saliva se ha observado en la combinación de *L. longipalpis*-*L. braziliensis*, donde la saliva facilita el paso de una infección transitoria en ratones a infecciones permanentes que muestran una enorme carga parasitaria (Samuelson y col., 1991; Lima y Titus, 1996). El incremento de la infectividad de *Leishmania*, cuando es inoculada junto con la saliva, ha sido descrito para *L. major* (Titus y Ribeiro, 1988), *L. braziliensis* (Donnelly y col., 1998) y *L. amazonensis* (Norsworthy y col., 2004; Laurenti y col., 2009a). El efecto de la saliva sobre la infectividad de *Leishmania* en modelos viscerales no parece ser tan evidente (Molina, 1994; Paranhos-Silva y col., 2003; Gomes y col., 2008). En el caso de la infección por especies viscerotrópicas, únicamente se ha demostrado el agravamiento de la infección por *L. infantum* en presencia de saliva de *L. longipalpis* en cricetos, agravamiento que se evaluó mediante la medida de la lesión dérmica causada (Warburg y col., 1994).

El efecto potenciador de la infección de *Leishmania* spp. producido por la saliva de los flebotomos se debe a sus propiedades antihemostáticas e inmunomoduladoras. En *L. longipalpis*, dichos efectos se han atribuido al maxadilano pues es capaz de exacerbar la infección por *L. major* en la misma medida que el extracto salival completo (Morris y col., 2001). En presencia de este péptido la respuesta inmune está polarizada hacia una respuesta de tipo Th2 (IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$ ) (Brodie y col., 2007). El maxadilano, al igual que la saliva de *L. longipalpis*, parece modular la función de las células dendríticas, disminuyendo la expresión de moléculas coestimuladoras y quimioquinas (Costa y col., 2004; Wheat y col., 2008). Asimismo, inhibe la activación de las células T, reduciendo la producción de TNF, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y óxido nítrico (Qureshi y col., 1996; Soares y col., 1998; Gillespie y col., 2000). También se ha observado que la saliva de *L. longipalpis* induce la apoptosis en neutrófilos, derivando en un incremento de la carga parasitaria (Prates y col., 2011).

Estudios posteriores con la saliva de flebotomos del Viejo Mundo apoyan las observaciones realizadas por Titus y Ribeiro en 1988. La infección por *L. major* también se ve exacerbada en presencia de la saliva de su vector natural, *P. papatasi* (Belkaid y col., 1998). Dada la ausencia de maxadilano en la saliva de flebotomos del Viejo Mundo, se ha sugerido que la adenosina y el AMP juegan un papel importante favoreciendo la infección en este modelo (Ribeiro y col., 1999; Katz y col., 2000). La adenosina modula el sistema inmune en el modelo murino, induciendo la producción de IL-10 y reduciendo los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-12 (Hasko y Cronstein, 2004). La adenosina y el AMP interfieren también con la función de las células dendríticas y los macrófagos, disminuyendo la expresión del gen de la óxido nítrico sintasa (Katz y col., 2000).

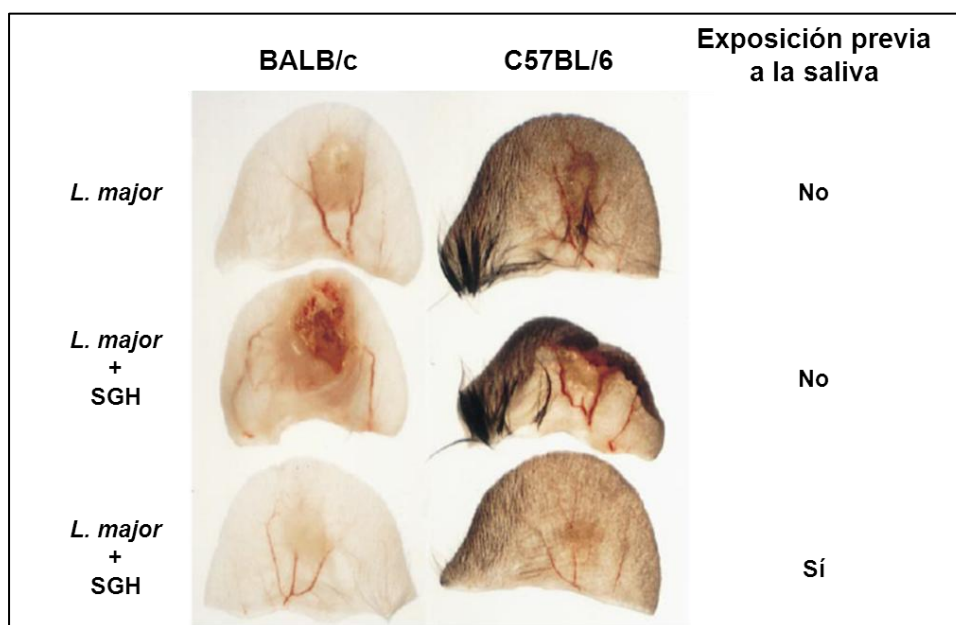
La hialuronidasa, enzima presente en la saliva de *Lutzomyia* y *Phlebotomus*, ha sido involucrada recientemente en la diseminación parasitaria ya que la inyección en ratones de promastigotes de *L. major* en presencia de esta enzima recombinante produce lesiones de mayor severidad que los animales inoculados únicamente con promastigotes (Volfova y col., 2008). Una endonucleasa de *L. longipalpis*, recientemente denominada Lundep, favorece la infección de *L. major* destruyendo las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), consistentes en mallas de ADN que incluyen histonas y proteínas antimicrobianas liberadas por los neutrófilos al espacio extracelular, inmovilizando los parásitos (Chagas y col., 2014).

La saliva de *P. papatasi* promueve en ratones la inducción de IL-4 en el punto de inoculación (Belkaid y col., 1998). Asimismo, tanto la saliva de *P. papatasi* como la de *P. sergenti* reducen la proliferación de esplenocitos murinos activados por mitógeno y la producción de IFN- $\gamma$  (Rohoušová y col., 2005b). Estos estudios sugieren que un primer contacto entre el hospedador vertebrado y la saliva de los flebotomos da lugar a la polarización de la respuesta inmune hacia una respuesta Th2, lo que favorece la supervivencia y el establecimiento del parásito (Gomes y Oliveira, 2012).

#### 1.4.4.2 El papel protector de la saliva frente a la leishmaniosis

La exposición previa a la saliva de diversos artrópodos confiere cierta protección frente a la infección de los patógenos transmitidos por ellos. A finales del siglo XX ya se había demostrado que la exposición a las picaduras de *Dermacentor andersoni*, *Ixodes scapularis* y *Rhipicephalus appendiculatus* no infectados protegían a los animales de experimentación frente a una posterior infección con *Franciscella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* y el virus Thogoto, respectivamente (Bell y col., 1979; Jones y Nuttall, 1990; Wikel y col., 1997; Nazario y col., 1998).

En flebotomos, la exposición de ratones, cricetos o perros a la saliva, bien a través de las picaduras de hembras no infectadas o a través de la inoculación de extracto salival a nivel dérmico, confiere, en la mayoría de los casos, protección frente a la infección por *Leishmania* spp. (Figura 19, Tabla 3).



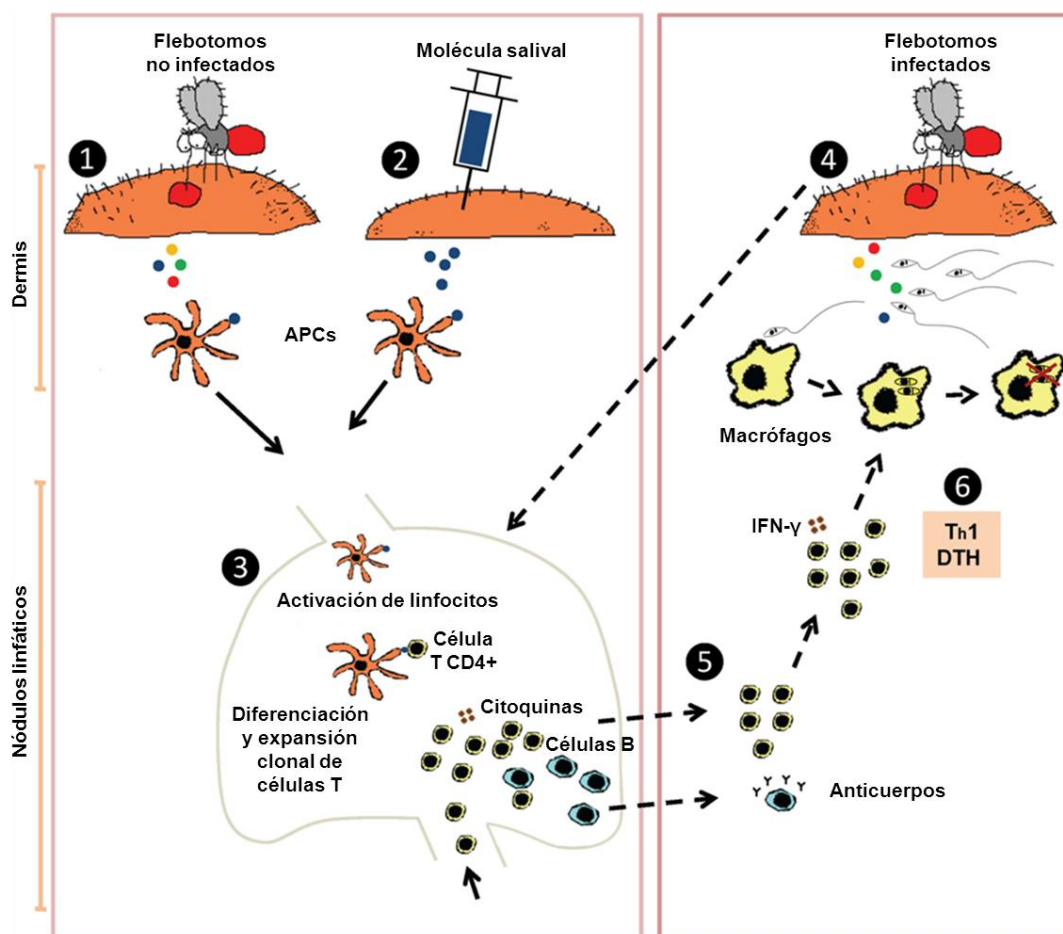
**Figura 19.** Efecto de la saliva sobre la infección por *L. major* en ratones expuestos o no al extracto salival de *L. longipalpis*. Fuente: Imagen modificada de Belkaid y col. (1998).

**Tabla 3. Recopilación de trabajos sobre el efecto protector de la saliva de los flebotomos frente a la leishmaniosis**

Flebotomo	Tratamiento	Modelo animal	Combinación parásito-flebotomo	Protección	Referencias
<i>P. papatasi</i>	SGH	Ratón	<i>L. major</i> + <i>P. papatasi</i> SGH	Sí	Belkaid y col., 1998; Oliveira y col., 2008; Ben Hadj Ahmed y col., 2010; Ben Hadj Ahmed y col., 2011
<i>P. papatasi</i>	Picaduras	Ratón	<i>L. major</i> + <i>P. papatasi</i> infectados	Sí	Kamhawi y col., 2000
<i>P. duboscqi</i>	Picaduras	Ratón	<i>L. major</i> + <i>P. duboscqi</i> SGH	Sí	Rohoušová y col., 2011a
<i>L. longipalpis</i>	SGH	Criceto	<i>L. infantum</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	No	Gomes y col., 2008
<i>L. longipalpis</i>	SGH	Ratón	<i>L. major</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Sí	Xu y col., 2011b
<i>L. longipalpis</i>	SGH	Ratón	<i>L. amazonensis</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Sí	Thiakaki y col., 2005
<i>L. longipalpis</i>	SGH	Ratón	<i>L. amazonensis</i> + <i>P. sergenti</i> SGH	No	Thiakaki y col., 2005
<i>L. longipalpis</i>	SGH	Ratón	<i>L. amazonensis</i> + <i>P. papatasi</i> SGH	No	Thiakaki y col., 2005
<i>L. intermedia</i>	SGH	Ratón	<i>L. braziliensis</i> + <i>L. intermedia</i> SGH	No	de Moura y col., 2007
<i>L. longipalpis</i>	SGH	Criceto	<i>L. braziliensis</i> + <i>L. intermedia</i> SGH	Sí	Tavares y col., 2011
<i>L. longipalpis</i>	SGH	Criceto	<i>L. braziliensis</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Sí	Tavares y col., 2011
<i>L. longipalpis</i>	SGH	Perro	<i>L. infantum</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Sí	Aguiar-Soares y col., 2014
<i>P. duboscqi</i>	Picaduras	Ratón	<i>L. major</i> + <i>P. duboscqi</i> infectados	Sí	Teixeira y col., 2014

Para explicar esta protección han planteado 2 hipótesis, no excluyentes, La primera atribuye el efecto de protección a los **anticuerpos antisaliva** que neutralizan los componentes salivales responsables del agravamiento de la infección (Belkaid y col., 1998; Morris y col., 2001; Costa y col., 2004). Los niveles de anticuerpos antisaliva se correlacionan con la aparición de una inmunidad protectora frente a la infección de *Leishmania* spp. (Gomes y col., 2002). Sin embargo, el papel protector de los anticuerpos antisaliva ha sido ampliamente cuestionado, ya que la incidencia de la leishmaniosis sigue siendo elevada a pesar de la constante exposición de la población a las picaduras no infectivas en zonas endémicas y la consecuente generación de anticuerpos en estas poblaciones (Rohoušová y col., 2005a; Rohoušová y Volf, 2006). La segunda hipótesis, más aceptada actualmente, establece que la protección es debida a **la respuesta celular de tipo DTH**, con incremento de niveles de INF- $\gamma$  e IL-12 y reducción de IL-4 en el lugar de la picadura, promoviendo un ambiente inhóspito para la supervivencia del parásito (Figura 20). Estos parámetros son indicadores de la activación de los macrófagos y la temprana destrucción de *Leishmania*, además de la polarización hacia una respuesta Th1 a nivel dérmico (Kamhawi y col., 2000; Valenzuela y col., 2001a; Oliveira y col., 2006; Gomes y col., 2008; Oliveira y col., 2008; Collin y col., 2009; Gomes y col., 2012; Aguiar-Soares y col., 2014).

En un primer contacto con la saliva se produce un incremento de citoquinas Th2 (fundamentalmente IL-4) por parte de las células epidérmicas. En condiciones de preexposición a la saliva, tras una nueva picadura, esta inclinación hacia una respuesta Th2 es anulada (Belkaid y col., 1998). Excepcionalmente, la preexposición a *L. intermedia* no sólo no protege, sino que agrava la infección por *L. braziliensis* (de Moura y col., 2007). Ese incremento de la carga parasitaria se ha relacionado con bajos ratios de IFN- $\gamma$ /IL-4 (de Moura y col., 2010), a pesar de que la exposición a la saliva de *L. intermedia* promueve en ratones y humanos ambos tipos de respuesta (humoral y celular) con inducción de genes relacionados con IFN- $\gamma$  en el lugar de la picadura (Weinkopff y col., 2014).



**Figura 20. Modelo hipotético del mecanismo protector inducido por la saliva de los flebotomos frente a la infección por *Leishmania*.** Inmunización con la saliva a través de 1) las picaduras de flebotomos no infectados o 2) por administración de una molécula de la saliva. 3) Captación de las proteínas salivales por las células presentadoras de antígeno (APCs), y activación, diferenciación y expansión clonal de linfocitos T CD4+ en los nódulos linfáticos. 4) Picadura infectiva posterior. 5) Rápido reclutamiento de las células T, mayoritariamente CD4+ productoras de IFN-γ, desde los nódulos linfáticos hasta la dermis. 6) Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) con reclutamiento celular en el lugar de la picadura y activación de macrófagos mediada por IFN-γ que promueve la destrucción de *Leishmania*. Fuente: Imagen modificada de Gomes y Oliveira (2012).

De forma individual se han ensayado diversos componentes salivales como candidatos vacunales con resultados prometedores, fundamentalmente el maxadilano de *L. longipalpis*, la proteína PpSP15 de *P. papatasi* y otras proteínas de *L. longipalpis* o *L. intermedia* (Tabla 4).



**Tabla 4. Proteínas de la saliva de los flebotomos ensayadas como vacunas frente a la leishmaniosis en modelos *in vivo*.**

Proteína		Tipo de Inmunización	Modelo animal	Combinación parásito-flebotomo	Respuesta inmune	Protección	Referencia
Nombre	Especie						
Maxadilano	<i>L. longipalpis</i>	Proteína	Ratón	<i>L. major</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Celular y humoral	Sí	Morris y col., 2001
PpSP15	<i>P. papatasi</i>	ADN	Ratón	<i>L. major</i> + <i>P. papatasi</i> SGH	Celular y humoral	Sí	Valenzuela y col., 2001; Oliveira y col., 2008, Zahedifard y col., 2014 Oliveira y col., 2008
PpSP44	<i>P. papatasi</i>	ADN	Ratón	<i>L. major</i> + <i>P. papatasi</i> SGH	Celular y humoral	No	
LJM19	<i>L. longipalpis</i>	ADN	Criceto	<i>L. infantum</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Celular	Sí	
LJM19	<i>L. longipalpis</i>	ADN	Criceto	<i>L. infantum</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Celular	Sí	da Silva y col., 2011
LJM19	<i>L. longipalpis</i>	ADN	Criceto	<i>L. braziliensis</i> + <i>L. intermedia</i> SGH	Celular	Sí	Tavares y col., 2011
LJM19	<i>L. longipalpis</i>	ADN	Criceto	<i>L. braziliensis</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Celular	Sí	Tavares y col., 2011
LJM17	<i>L. longipalpis</i>	ADN	Criceto	<i>L. infantum</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Celular y humoral	No	Gomes y col., 2008
LJL11	<i>L. longipalpis</i>	ADN	Criceto	<i>L. infantum</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Humoral	No	Gomes y col., 2008
LJM11	<i>L. longipalpis</i>	ADN	Criceto	<i>L. infantum</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Celular y humoral	Parcial	Gomes y col., 2008
LJM11	<i>L. longipalpis</i>	ADN	Ratón	<i>L. major</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Celular y humoral	Sí	Xu y col., 2011
LJM11	<i>L. longipalpis</i>	Proteína	Ratón	<i>L. longipalpis</i> infectadas con <i>L. major</i>	Celular y humoral	Sí	Gomes y col., 2012
LJM11	<i>L. longipalpis</i>	Vacuna basada en <i>Listeria</i>	Ratón	<i>L. longipalpis</i> infectadas con <i>L. major</i>	Celular	Parcial	Abi Abdallah y col., 2014
LJL143 (lufaxina)	<i>L. longipalpis</i>	ADN	Ratón	<i>L. major</i> + <i>L. longipalpis</i> SGH	Celular	No	Xu y col., 2011
Linb11	<i>L. intermedia</i>	ADN	Ratón	<i>L. braziliensis</i> + <i>L. intermedia</i> SGH	Celular	Sí	de Moura y col., 2013

Ratones vacunados con el péptido recombinante maxadilano desarrollan una respuesta humoral y celular protectora frente a la infección por *L. major* (Morris y col., 2001). Sin embargo, se ha identificado una acusada variabilidad en las zonas de la secuencia aminoacídica de mayor inmunogenicidad del maxadilano en diversas poblaciones de *L. longipalpis*, no viéndose alterados los efectos vasodilatadores (Lanzaro y col., 1999). Una vacuna genérica y efectiva frente a maxadilano debería incluir todas las variantes descritas (Milleron y col., 2004a).

La proteína de 15 kDa, PpSP15, es mayoritaria en la fracción proteica que confiere protección frente a la infección por *L. major*. Se ha ensayado como vacuna de ADN, desarrollando una marcada protección frente a la LC causada por *L. major* (Valenzuela y col., 2001a; Oliveira y col., 2008). La vacuna produce una respuesta inmune tanto humoral como celular (DTH), aunque la protección es atribuida a la respuesta celular, ya que ratones deficientes en células B también generaron protección frente a la infección (Valenzuela y col., 2001a). PpSP15 muestra una reducida variabilidad entre poblaciones de *P. papatasi* de Sudán, Egipto, Jordán, Israel y Arabia Saudí, convirtiéndose en un buen candidato vacunal (Elnaiem y col., 2005). Una novedosa aproximación, la vacunación con *Leishmania tarentolae* recombinante que expresa *in vivo* cistein proteinasas en combinación con PpSP15 en forma de vacuna de ADN protege ratones de la infección por *L. major* (Zahedifard y col., 2014).

El análisis de las proteínas responsables de la producción de una respuesta DTH en ratones, ha permitido identificar potenciales vacunas frente a la infección por *Leishmania* spp. (Oliveira y col., 2006; Oliveira y col., 2008; Collin y col., 2009). Esta aproximación también ha conducido al aislamiento de una molécula de la saliva de *P. papatasi* (PpSP44) que, a pesar de producir un reclutamiento celular en el lugar de la picadura, genera una inducción de IL-4 y no de IFN- $\gamma$  (respuesta contraria a PpSP15), promoviendo un agravamiento de la infección por *L. major*. Estos hallazgos sugieren que no sólo la respuesta DTH está vinculada a la protección frente a *Leishmania*, sino que debe existir una producción de IFN- $\gamma$  (Oliveira y col., 2008).

Con esta metodología se han identificado dos proteínas amarillas (LJM11 y LJM17) y otra de función desconocida (LJM19), como las moléculas responsables de la respuesta DTH que induce la saliva de *L. longipalpis* (Gomes y col., 2008). La inmunización de cricetos con LJM19 previene el desarrollo de LC y LV tras la infección por *L. braziliensis* y *L. infantum*, respectivamente (Gomes y col., 2008; da Silva y col., 2011; Tavares y col., 2011). Incluso se ha ensayado la administración conjunta de LJM19 y la proteína

conservada de *Leishmania*, KMP11, en forma de vacuna de ADN, proporcionando la protección de cricetos frente a la infección por *L. infantum*. Esta protección fue similar a la obtenida mediante la vacunación con estos componentes por separado (da Silva y col., 2011). Las proteínas LJL143 y LJM17 de la saliva de *L. longipalpis* producen en el perro una respuesta inmune celular caracterizada por infiltración celular y expresión de IFN- $\gamma$  y IL-12 en el lugar de la picadura (Collin y col., 2009).

Las proteínas amarillas poseen ciertos atributos que las convierten en buenos candidatos vacunales frente a *Leishmania* spp.: son inmunogénicas y producen una polarización hacia una respuesta inmune protectora (Th1), su inmunogenicidad está conservada en diversos reservorios y no existen homólogos en mamíferos. Su estructura y función ha sido recientemente caracterizada (Xu y col., 2011). LJM11, proteína amarilla presente en la saliva de *L. longipalpis*, es capaz de inducir una respuesta humoral y celular en cricetos, dando lugar a una protección no duradera frente a la infección por *L. infantum* (Gomes y col., 2008). Sin embargo, la vacunación con el ADN plasmídico o la proteína recombinante LJM11 protege a los ratones frente al desarrollo de lesiones cutáneas causadas por *L. major*, en ausencia de adyuvante. Esta inmunidad protectora se debe a las células CD4+ y no a los anticuerpos generados frente a LJM11 (Xu y col., 2011; Gomes y col., 2012). La vacunación de ratones mediante la inoculación intravenosa de *Listeria monocytogenes* recombinante capaz de expresar LJM11 *in vivo* otorga una protección a corto plazo frente la infección por *L. major* (Abi Abdallah y col., 2014). Recientemente se han descrito dos proteínas de la saliva de *L. longipalpis* que pueden ser candidatos vacunales en perros, la proteína amarilla LJM17 y la lufaxina LJL143 (Collin y col., 2009).

Es interesante el hallazgo de diferencias en el efecto protector de la saliva entre flebotomos procedentes del campo y de colonias establecidas en el laboratorio. Así, la protección de ratones frente a la infección por *L. major*, mediada por la saliva de *P. papatasi* procedentes del laboratorio, no se produce al emplear *P. papatasi* capturados en el campo (Ahmed y col., 2010; Ben Hadj Ahmed y col., 2010; Ben Hadj Ahmed y col., 2011). La saliva de *L. longipalpis* procedente de colonias exacerba la infección por *L. amazonensis* de forma más potente que la saliva de *L. longipalpis* capturados en el campo. Muestran además diferencias a nivel de quimiotaxis de macrófagos e inmunomodulación, hecho confirmado por la variación en la producción de citoquinas (Laurenti y col., 2009a; Laurenti y col., 2009b). Se ha sugerido que estas diferencias pueden estar relacionadas con la variación en el contenido proteico de las glándulas salivales (Gomes y Oliveira, 2012).

#### **1.4.4.3 La saliva como marcador de exposición a la picadura de flebotomos**

El desarrollo de anticuerpos frente a la saliva de los artrópodos hematófagos es específicamente dependiente de la exposición a estos. La correlación entre los niveles de anticuerpos de tipo IgG antisaliva y la exposición a los artrópodos se evidenció por primera vez con sueros de campesinos que habían estado en contacto con las picaduras de *Ixodes damini* en New Jersey (Schwartz y col., 1990). Posteriormente, otros estudios serológicos han puesto de manifiesto la cinética estacional de estos anticuerpos coincidente con el periodo de actividad de los artrópodos (Schwartz y col., 1990; Palosuo y col., 1997; Peng y col., 2002).

Por tanto, los anticuerpos antisaliva de los artrópodos podrían ser de utilidad como indicadores de la exposición a estos. Esta herramienta sería de gran interés en estudios epidemiológicos, ya que de una manera sencilla arrojaría información complementaria a las encuestas entomológicas. Así, no sólo conoceríamos la densidad de insectos en una zona, sino el nivel de exposición a las picaduras al que los habitantes o reservorios están sometidos. Existen estudios que avalan el potencial de esta novedosa metodología como una herramienta útil para determinar la eficacia de campañas de lucha antivectorial. La disminución de los niveles de anticuerpos antisaliva en una población, tras la incorporación de medidas antivectoriales, implicaría un éxito en dicha campaña, tal y como ha ocurrido en Nepal o Angola tras el uso de mosquiteras impregnadas con insecticida en zonas endémicas de leishmaniosis y malaria, respectivamente (Drame y col., 2010; Gidwani y col., 2011). Recientemente, se ha puesto de manifiesto la utilidad de los gallos como animales centinela para monitorizar la exposición a los flebotomos, ya que estas aves también desarrollan anticuerpos específicos (Soares y col., 2013), tal y como se ha realizado en programas de control de virus transmitidos por culícidos en Estados Unidos (Trevejo y col., 2005).

Esta metodología se ha utilizado en algunas zonas endémicas de Brasil e India para estimar la exposición de humanos a las picaduras de *L. longipalpis* y *P. argentipes*, respectivamente (Barral y col., 2000; Clements y col., 2010; Souza y col., 2010; Teixeira y col., 2010), dando buenos resultados al trabajar con el homogeneizado de la saliva como antígeno. La dificultad en la obtención del antígeno salival mediante disección y la diversidad de la saliva, inter e intraespecífica, ha hecho que, se tienda a la utilización de marcadores más concretos. En Brasil se han empleado las proteínas recombinantes amarillas LJM11 y LJM17 de *L. longipalpis*, con resultados prometedores (Souza y col., 2010; Soares y col., 2013).

Los anticuerpos antisaliva están siendo utilizados también para medir la exposición de humanos o animales domésticos a diferentes vectores tales como *Anopheles* spp., mosca tse-tse o *Triatoma infestans* (Poinsignon y col., 2008; Schwarz y col., 2009b; Drame y col., 2011).

Objetivos

---



## 2 OBJETIVOS

En los últimos años son numerosos los estudios que han resaltado la importancia de las proteínas de la saliva de los artrópodos como moléculas inmunogénicamente activas implicadas en el curso de la infección de las enfermedades vectoriales que transmiten. Recientemente, los análisis sobre la saliva de los flebotomos están focalizados en la epidemiología y control de la leishmaniosis y por tanto, en la exploración de su potencial como vacunas o como marcadores de la exposición. En este contexto, la propuesta de esta Tesis ha sido profundizar en el estudio de las propiedades del contenido proteico de la saliva de *P. perniciosus* para evaluar su posible aplicación en la ecoepidemiología y control de la leishmaniosis en España y buena parte de la cuenca mediterránea.

Por tanto, con la finalidad de abordar este propósito se establecieron los siguientes objetivos concretos en la presente Tesis Doctoral:

1. Caracterización del contenido proteico de la saliva de *P. perniciosus* mediante electroforesis bidimensional.
2. Inmunización de animales de laboratorio a través de la picadura de *P. perniciosus* y estudio de la especificidad y de la cinética de los anticuerpos IgG antisaliva.
3. Identificación de las proteínas antigénicas presentes en la saliva de *P. perniciosus*.
4. Construcción de una genoteca de expresión a partir de las glándulas salivales de *P. perniciosus* y obtención de antígenos salivales en forma de proteínas recombinantes.
5. Estandarización de una técnica de ELISA *in house* para evaluar el grado de exposición a la picadura de *P. perniciosus*.
6. Evaluación de las proteínas recombinantes de la saliva como marcadores de la exposición a la picadura de *P. perniciosus*.
7. Aplicación de la técnica de ELISA en el estudio de la exposición de los reservorios domésticos y silvestres a las picaduras de *P. perniciosus* en el contexto de un brote epidémico de leishmaniosis en la Comunidad de Madrid.

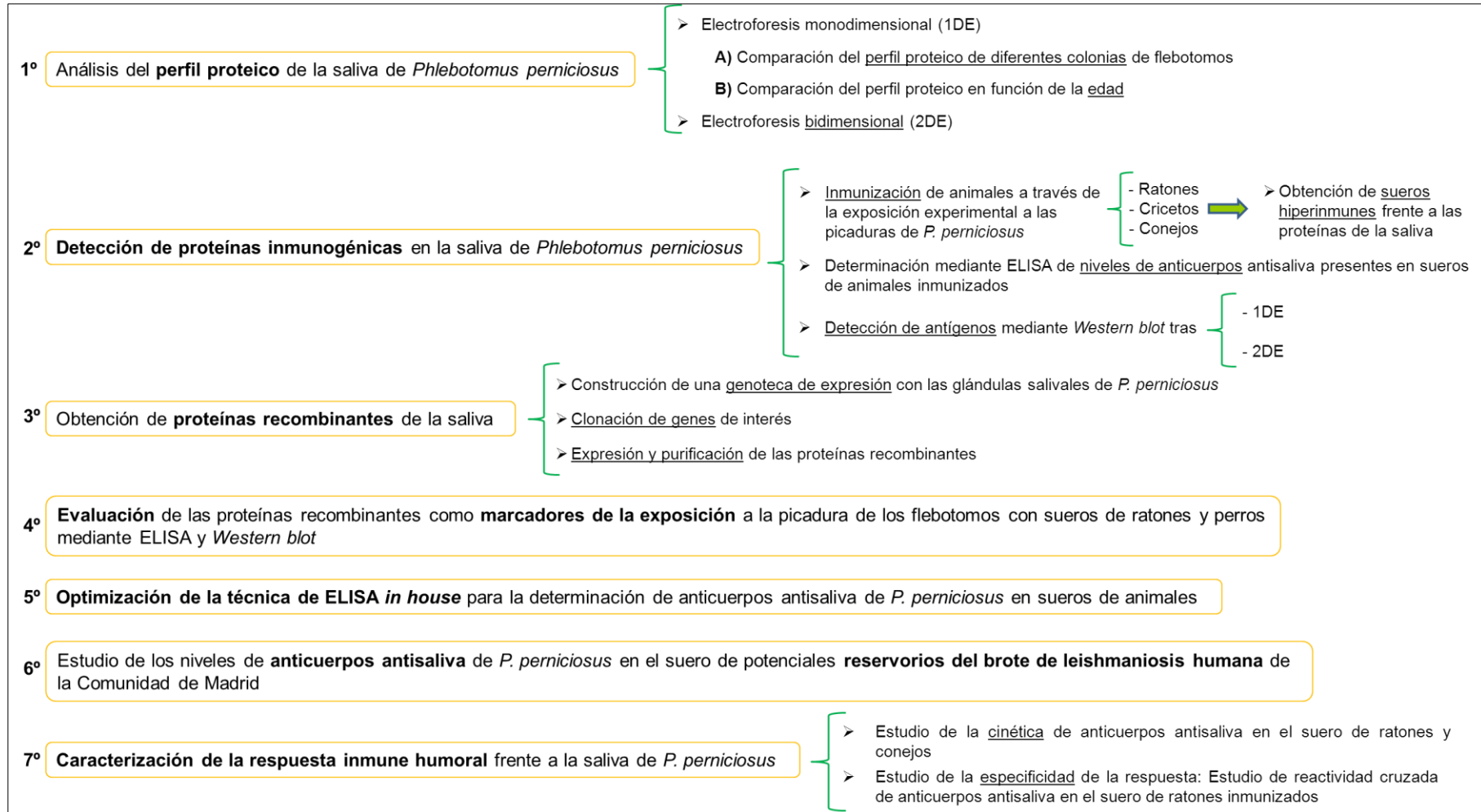




*Material y métodos*



## ESQUEMA DE TRABAJO





### **3 MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

##### **3.1.1 Flebotomos**

En esta Tesis se utilizó la saliva de las glándulas salivales extraídas de 4 colonias de flebotomos mantenidas en la Unidad de Entomología Médica (UEM) del Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda (Madrid).

El material de partida empleado consistió mayoritariamente en glándulas salivales de *P. perniciosus* procedentes de una colonia local establecida a partir de flebotomos capturados en Boadilla del Monte (Madrid), en 1987 (Molina, 1991). Además, se emplearon glándulas salivales de otras dos colonias de *P. perniciosus* mantenidas en el insectario de la UEM (ISCIII), procedentes de Valencia y Zaragoza.

La saliva de *P. argentipes* se utilizó tanto para la comparación del contenido proteico de diferentes especies de flebotomos como para el estudio de las reacciones cruzadas entre los anticuerpos antisaliva, mediante ELISA y WB. Esta colonia, establecida a partir de flebotomos capturados en la India, fue cedida en 1994 por el Prof. R. Killick-Kendrick a la UEM (ISCIII), donde se mantiene desde entonces.

Por otro lado, se trabajó con la saliva de las siguientes especies de flebotomos mantenidas en el Laboratorio de Biología de Vectores (LBV), Departamento de Parasitología, Universidad Carlos en Praga (CUNI):

- *P. perniciosus* procedente de Murcia, mantenida desde 1994.
- *P. sergenti* originaria de Israel, mantenida desde 2001.
- *P. papatasi* procedente de Turquía, mantenida desde 2005.
- *L. longipalpis* originaria de Brasil, mantenida desde 1991.

##### **3.1.2 Vectores de clonación**

###### **3.1.2.1 Fagos**

En la construcción de la genoteca de expresión se utilizó el fagémido  $\lambda$ TriplEx2 (Agilent Technologies®), ya que da lugar a genotecas de título elevado y posee una gran

facilidad de conversión de los clones de fago a plásmido vía recombinación específica mediada por el sistema de recombinasa Cre-lox.

### 3.1.2.2 Plásmidos

Vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>). Este vector presenta un tamaño de 3'9 Kb, y se utilizó en la clonación directa de productos de PCR mediante el sistema TOPO<sup>®</sup> TA (Invitrogen<sup>®</sup>), por su rapidez y facilidad.

Vector QIAexpress pQE31 (Qiagen<sup>®</sup>). De 3'4 Kb, permite la expresión heteróloga de altos niveles de proteínas de fusión unidas a seis residuos de histidina situados en la posición amino terminal. El gen *bla* les confiere resistencia a ampicilina.

Vector pGEX4T3 (Amersham Biotech<sup>®</sup>). De 4'9 Kb, permite la expresión de proteínas fusionadas a glutation-S-transferasa (GST) de 26 kDa, situada en el extremo amino terminal. Dicho vector presenta resistencia a ampicilina.

### 3.1.3 Cepas bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* empleadas fueron:

*E. coli* XL1-Blue (Clontech<sup>®</sup>), cuyo genotipo es: endA1, gyrA96, hsdR17, *lac*<sup>-</sup>, recA1, relA1, supE44, thi<sup>-</sup>1, [F' *lacI*<sup>q</sup>  $\Delta$ M15, proAB, Tn10], se empleó en la propagación de la genoteca.

*E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene<sup>®</sup>):  $\Delta$  (*mcrA*) 183,  $\Delta$  (*mcrCB*<sup>-</sup>*hsd* SMR<sup>-</sup> *mrr*) 173, endA1, supE44, thi<sup>-</sup>1, recA1, gyrA96, relA1, *lac*, [F' proAB, *lac* I<sup>q</sup>  $\Delta$ M15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>), Amy, cam<sup>r</sup>]<sup>c</sup>. Esta estirpe bacteriana se utilizó en el mantenimiento y replicación de los plásmidos recombinantes pQE31 y pGEX4T3.

*E. coli* TOP10 (Invitrogen<sup>®</sup>): F- *mcrA*  $\Delta$  (*mrr*<sup>-</sup>*hsdRMS*<sup>-</sup>*mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *nupG* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galE15* *galK16* *rpsL*(StrR) *endA1*  $\lambda$ -. Esta cepa se empleó en el mantenimiento y replicación de los plásmidos recombinantes pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>).

BM25.8 (Clontech<sup>®</sup>) supE44, thi  $\Delta$ (*lac*-proAB) [F' *traD36*, proAB<sup>+</sup>, *lacI*<sup>q</sup>Z  $\Delta$ M15]  $\lambda$ imm434 (*kanR*)P1 (*cam*<sup>R</sup>) *hsd*<sup>R</sup> (*r*<sub>k12</sub><sup>-</sup> *m*<sub>k12</sub><sup>-</sup>). Debido a las características lisogénicas y por proporcionar la actividad Cre-recombinasa, esta cepa fue de utilidad en la conversión de los fagos recombinantes  $\lambda$ TriplEx2, en sus correspondientes plásmidos pTriplEx2 (Clontech<sup>®</sup>).

M15 (Qiagen®), NalS, StrS, RifS, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>. Dicha cepa se empleó en la expresión de las proteínas recombinantes clonadas en el vector pQE31 (Qiagen®).

BL21 (Amersham Biotech®) [F<sup>-</sup>, omp T, hsdS (rB<sup>-</sup>,mB<sup>-</sup>), gal], se empleó en la expresión de la proteína recombinante GST, cuya secuencia forma parte del vector pGEX4T3 (Amersham Biotech®).

*ArcticExpress* (Agilent Technologies®). *E. coli* B F- *ompT hsdS* (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal* *endA* Hte [*cpn10 cpn60* Gent<sup>r</sup>. Se hizo uso de esta cepa en la expresión de la proteínas recombinantes clonadas en el vector pGEX4T3 (Amersham Biotech®).

El mantenimiento de las distintas cepas bacterianas se realizó mediante la congelación a -70°C de alícuotas de 2 ml de una suspensión celular en medio LB/ampicilina (100 µg/ml) y en presencia de glicerol estéril al 15%.

### 3.1.3.1 Medios de cultivo

En la Tabla 5 se detalla la composición de los medios de cultivo empleados en el crecimiento y mantenimiento de todas las cepas bacterianas.

**Tabla 5. Composición de los medios definidos utilizados en el mantenimiento de las bacterias.**

Medios de cultivo	
<b>LB líquido</b>	Tryptona 10 g/L; extracto de levadura 5 g/L; NaCl 5 g/L. pH 7'5.
<b>LB sólido</b>	Agar 15 g/L; triptona 10 g/L; extracto de levadura 5 g/L; NaCl 5 g/L. pH 7'5
<b>SOC</b>	LB líquido suplementado con MgSO <sub>4</sub> 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 10 mM; glucosa 0'2%.

## 3.2 MÉTODOS

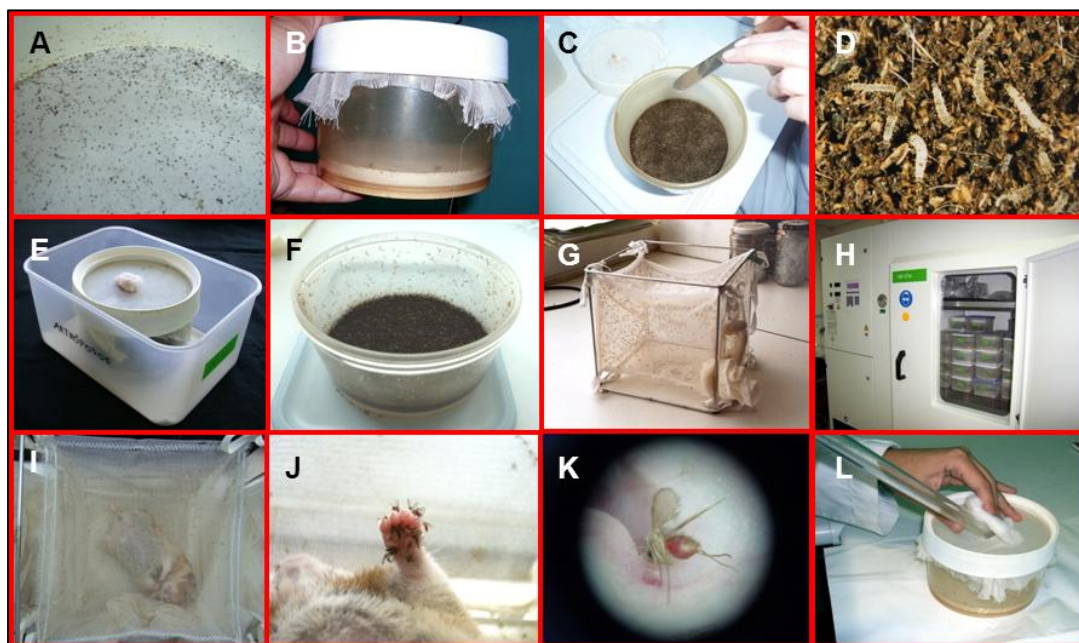
### 3.2.1 Experimentación animal

Todos los experimentos con animales contemplados en esta Tesis Doctoral cumplen con la normativa vigente sobre manejo y cuidado de animales en materia de experimentación y bienestar animal (RD 53/2013). Los procedimientos, que fueron aprobados por el Comité de Bioética del ISCIII (código PA 225/08), forman parte de los experimentos recogidos en el proyecto de investigación AGL2008-01592 concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN).



### 3.2.2 Mantenimiento de colonias de flebotomos

Todas las fases del ciclo vital de los flebotomos se mantienen en una cámara climática (VB0714, Heratec Technologies, Vötsch Industrietechnik) con unas condiciones ambientales controladas: 27-28°C, humedad relativa del 95-100% y un fotoperiodo de 17 h de luz y 7 h de oscuridad. Los individuos adultos, tanto machos como hembras, se alimentan mediante pellas de algodón empapadas en una solución saturada de sacarosa. Con objeto de permitir la oviposición, las hembras son alimentadas con sangre de un criceto, previamente anestesiado (ketamina 150 mg/kg por vía intramuscular), e introducido durante una hora en una jaula que contiene los flebotomos. Al día siguiente, las hembras de flebotomo que han ingerido sangre se trasvasan a frascos de mantenimiento larvario para que efectúen la puesta y se inicie una nueva generación de estos insectos. Las cuatro etapas larvarias son alimentadas con una mezcla a partes iguales de heces y pienso de conejo (Molina, 1991) (Figura 21).

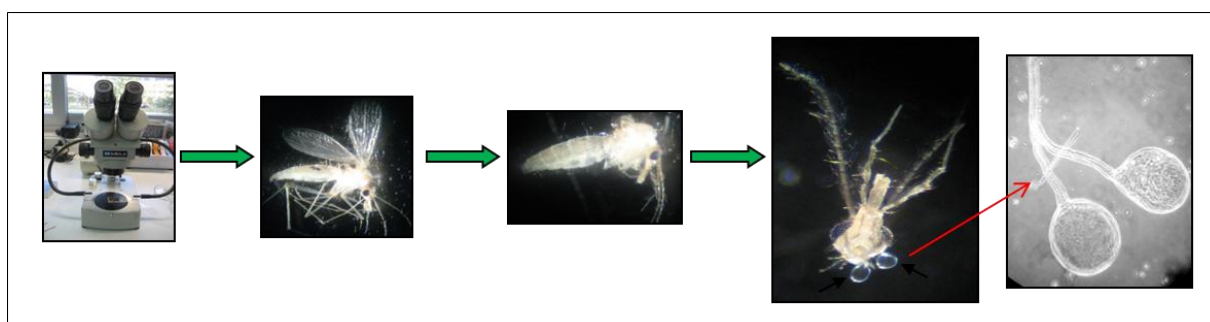


**Figura 21.** Mantenimiento de colonias de flebotomos en el laboratorio. A) Huevos en frasco de oviposición. B, E y F) Frascos de mantenimiento larvario. C) Alimentación de larvas. D) Detalle de larvas. G) Adultos en jaula de mantenimiento. H) Cámara climática. I y J) Alimentación con sangre de criceto. K) Hembra recién alimentada. L) Traslado de las hembras alimentadas a frascos de oviposición. Fuente: UEM (ISCIII).

### 3.2.3 Obtención de la saliva de flebotomos

Para la extracción de glándulas salivales se llevaron a cabo disecciones de hembras de flebotomos, con ayuda de un microscopio estereoscópico y agujas entomológicas

(Figura 22). Las hembras se anestesiaron con dióxido de carbono y se depositaron en una placa de Petri que contenía PBS enfriado al que se añadió una gota de detergente líquido. Esto disuelve las ceras presentes en la cutícula del insecto y permite que se sumerja, facilitando así su manipulación. Para la extracción de las glándulas salivales se depositan tres gotas de PBS frío sobre un portaobjetos. Sobre la primera gota se procede a la eliminación de las patas y las alas de la hembra. A continuación se transfiere el cuerpo del flebotomo a la segunda gota, se separa la cabeza y se traslada a la tercera gota de PBS, donde se disecan las glándulas salivales. La extracción de las glándulas se efectúa con la ayuda de agujas entomológicas extrafinas (0'1 mm de diámetro) y con la máxima precaución, para impedir su ruptura y la consecuente liberación de la saliva. Todos estos pasos ayudan además a la eliminación de los restos de detergente y a limpiar la muestra de pelos y escamas desprendidos del cuerpo de los flebotomos. El número de glándulas salivales extraídas para la realización de todos los experimentos recogidos en esta Tesis Doctoral asciende a unas 8.000.



**Figura 22. Disección y extracción de glándulas salivales de flebotomos. Fuente: UEM (ISCIII).**

Para la obtención de las glándulas salivales y preparación de los extractos proteicos se tuvieron en cuenta los siguientes factores: la edad de los flebotomos, el medio utilizado en las disecciones, el modo de almacenamiento de las glándulas y el método de lisis de las mismas. Estos factores variaron según la finalidad de los experimentos a realizar. Durante las disecciones, las glándulas se conservaron en hielo y, al finalizar, los viales fueron almacenados a -70°C.

### **3.2.4 Análisis del perfil proteico de la saliva de flebotomos mediante electroforesis monodimensional**

#### **3.2.4.1 Electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida**

Las glándulas salivales destinadas a la separación electroforética mediante SDS-PAGE fueron recogidas en PBS. El extracto proteico se obtuvo con un procesador de

ultrasonidos y sonotrodo para pequeños volúmenes (Labsonic, Sartorius®). La sonicación de cada vial se realizó mediante 25 pulsos con intervalos de 0.7 segundos a una intensidad del 100%. Posteriormente, tras agrupar el extracto de varios viales, para disponer así de un volumen mayor, se procedió a otros dos ciclos de sonicación de 50 y 25 pulsos cada uno para asegurar la ruptura total del material de partida. Se centrifugó a máxima velocidad en minifuga refrigerada durante 5 min y el sobrenadante fue repartido en alícuotas y almacenado a -70°C.

La cuantificación del extracto proteico se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico, empleando BSA como estándar, siguiendo las indicaciones del fabricante (*Micro BCA Protein Assay Kit*, Thermo Scientific®).

Las muestras proteicas se separaron mediante electroforesis monodimensional en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970) y en presencia de agentes reductores. Las muestras se diluyeron en una proporción 1:1 (v/v) en tampón Laemmli (TrisHCl 62.5 mM, pH 6.8; glicerol 25%, SDS 2% y azul de bromofenol 0.01%) en presencia de 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Bio-Rad®). Antes de cargar las muestras en el gel, éstas se hirvieron durante 5 min, a continuación se mantuvieron en hielo durante 5 min y se clarificaron por centrifugación a la máxima velocidad en una microcentrífuga. En la Tabla 6 se muestran los volúmenes empleados para la preparación de los geles.

**Tabla 6. Protocolo para la preparación de geles de acrilamida.**

	Geles de separación		Gel de empaquetamiento
	12%	15%	5%
Agua destilada	2.48 ml	1.74 ml	2 ml
Solución de acrilamida/ poliacrilamida al 30%, (Conda®)	3 ml	3.75 ml	888 $\mu$ l
Solución de separación	1.9 ml	1.9 ml	-
Solución de empaquetamiento	-	-	600 $\mu$ l
Persulfato amónico al 10%	112 $\mu$ l	112 $\mu$ l	56 $\mu$ l
TEMED (Bio-Rad®)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l
<b>Volumen final</b>	<b>7.5 ml</b>	<b>7.5 ml</b>	<b>3.6 ml</b>

La composición de las soluciones de separación y empaquetamiento se detallan en la Tabla 7. Para los geles de 9 x 7 cm se utilizó el sistema de electroforesis vertical Mini-ATTO (Biogen®).

**Tabla 7. Soluciones empleadas en la preparación de geles de acrilamida.**

Geles de acrilamida	
<b>Separación</b>	18'17 g Tris base; 4 ml de SDS al 10%; agua destilada (Bio-Rad®) c.s.p. 100 ml; pH 8'8.
<b>Empaquetamiento</b>	6'06 g Tris base; 4 ml de SDS al 10%; agua destilada (Bio-Rad®) c.s.p. 100 ml; pH 6'8.

Como patrón de peso molecular se usó el marcador de amplio rango de peso molecular 2-250 kDa (*Precision Plus Protein Dual Xtra Standards*, Bio-Rad®). La migración electroforética se realizó a 15 mA en el gel de empaquetamiento y a 30 mA cuando el frente alcanzó el gel de separación.

#### **3.2.4.2 Comparación del perfil proteico de la saliva de diferentes colonias de flebotomos**

Se analizó mediante SDS-PAGE el perfil proteico de la saliva procedente de 15 glándulas de flebotomos de 5 a 7 días de edad de cada una de las diferentes colonias de nuestro insectario (*P. argentipes* de la India y *P. perniciosus* originarias de Madrid, Zaragoza y Valencia).

#### **3.2.4.3 Comparación del perfil proteico de la saliva de flebotomos en función de la edad**

Se analizó mediante SDS-PAGE el contenido proteico de 15 glándulas salivales de flebotomos de diferente edad, desde la emergencia del adulto (considerado como día 1) hasta los 8 días de edad. Se emplearon *P. perniciosus* procedentes de Madrid.

### **3.2.5 Electroforesis bidimensional de la saliva de *P. perniciosus* (2DE)**

#### **3.2.5.1 Preparación del extracto proteico**

En los experimentos de electroforesis bidimensional se utilizaron glándulas salivales procedentes de hembras de 4 a 8 días de edad, cuyas disecciones se realizaron en Tris 5 mM. Las glándulas se almacenaron en esta misma solución, generalmente en grupos de 20 glándulas por cada 10 µl.

El extracto proteico se preparó a partir de 60-150 glándulas a las que se añadió solución de lisis compatible con dicha técnica (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% y Tris 40 mM) hasta completar un volumen final de 80 µl. En algunas ocasiones se partió de un menor número de glándulas para favorecer la resolución de ciertas proteínas. En este caso, se completó el volumen hasta 80 µl con Tris 5 mM y se siguió la metodología descrita anteriormente. La lisis se prolongó durante 2 h a temperatura ambiente, en presencia de inhibidores de proteasas (GE Healthcare®).

#### **3.2.5.2 Isoelectroenfoque**

El extracto proteico resultante (Apartado 3.2.5.1), previa centrifugación, se diluyó en un volumen final de 200 µl de solución DeStreak (GE Healthcare®) en presencia de 1% de anfolitos (Bio-Rad®). Únicamente se disminuyó la concentración de anfolitos a la mitad (0'5%) cuando se emplearon tiras de pH de 7 a 11 (GE Healthcare®), ya que este hecho favorece la separación de las proteínas básicas. Esta mezcla de proteínas se aplicó sobre las tiras IPG de 11 cm y pH variable: pH 3-10, 4-7, 7-10 (Bio-Rad®) y 7-11 (GE Healthcare®); y se sometieron a hidratación activa (50 µA/tira) durante toda la noche. Una vez hidratadas, las tiras se sometieron a isoelectroenfoque a una temperatura constante de 20°C y una corriente máxima de 50 µA/tira, utilizando el sistema *Protean IEF cell* de Bio-Rad®. Las condiciones empleadas fueron 20 min a 250 V, 2 h y 50 min a 8.000 V y una fase final de incremento lineal del voltaje, hasta alcanzar 20.000 Vh. Tras el isoelectroenfoque, las tiras se guardaron a -20°C.

#### **3.2.5.3 Equilibrado y electroforesis en geles de acrilamida**

Tras la separación proteica de acuerdo al pI, las proteínas presentes en las tiras fueron equilibradas antes de la electroforesis. Para ello, las tiras se trataron con DTT (20 mg/ml) en solución de equilibrado (urea 6 M, TrisHCl 50 mM, pH 8'8, glicerol 30%, SDS 2% y azul de bromofenol 0'002%) durante 10 min, lo que provoca la reducción de los

enlaces disulfuro de las proteínas. En un segundo paso del equilibrado, las proteínas se sometieron a la alquilación de los grupos tiol para evitar la futura formación de puentes disulfuro. Ello se consiguió incubando las tiras con yodoacetamida (25 mg/ml) en solución de equilibrado, durante 10 min.

Los geles de poliacrilamida se prepararon únicamente con solución de separación al 15% (Apartado 3.2.4.1) utilizando agua libre de proteasas (Bio-Rad®), y se dispusieron sobre *cassettes* Criterion vacíos (Bio-Rad®). La migración electroforética se realizó a 200 V en una cubeta Criterion (Bio-Rad®).

### 3.2.5.4 Tinciones de proteínas compatibles con espectrometría de masas

La visualización del extracto salival tras la separación monodimensional y bidimensional se realizó con tinción con plata y tinción con azul de Coomassie coloidal, ambas compatibles con la espectrometría de masas.

#### 3.2.5.4.1 Tinción de proteínas con plata

Las proteínas se fijaron en el gel durante 1 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Tras incubar durante 1 h los geles con la solución de sensibilización, se procedió a realizar 5 lavados de 7 min con 150 ml de agua MilliQ. Posteriormente, los geles permanecieron durante 1 h en contacto con la solución de plata. Una vez retirada la solución se añadió la solución de revelado y se mantuvo unos minutos en agitación hasta que las bandas o *spots* fueron visibles, momento en el cual se retiró dicha solución y se paró la reacción con la solución de parada (Tabla 8).

**Tabla 8. Soluciones empleadas en la tinción de proteínas con plata**

Tinción con plata	
<b>Solución de fijación</b>	Etanol 40%; ácido acético 10%; agua MilliQ c.s.p. 250 ml/gel
<b>Solución de sensibilización</b>	Etanol 18%; tiosulfato sódico 0'2%; acetato sódico 6'8%; agua MilliQ c.s.p. 150 ml/gel
<b>Solución de plata</b>	Nitrato de plata 0'25%; agua MilliQ c.s.p. 150 ml/gel
<b>Solución de revelado</b>	Carbonato sódico 2'5%; formaldehído (al 37%) 0'04%; agua MilliQ c.s.p. 150 ml/gel
<b>Solución de parada</b>	Ácido acético 12%; agua MilliQ c.s.p. 250 ml/gel

#### 3.2.5.4.2 Tinción de proteínas con azul de Coomassie coloidal

Las proteínas se fijaron en los geles de acrilamida mediante tratamiento con la solución de fijación, durante al menos 3 h, a temperatura ambiente. Tras realizar 3 lavados de 10 min cada uno con 100 ml de agua MilliQ, para retirar el exceso de la solución de fijación, los geles se incubaron con la solución de equilibrado. Tras 1 h de incubación, se añadió el colorante azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad®) hasta alcanzar una concentración final de 0'06%, permaneciendo en incubación durante toda la noche. Los geles se aclararon con agua MilliQ hasta que el fondo alcanzó la mayor transparencia posible. La composición de las soluciones utilizadas en la tinción de proteínas con azul de Coomassie coloidal se describe en la Tabla 9.

**Tabla 9. Soluciones empleadas en la tinción de proteínas con azul de Coomassie coloidal**

Tinción con azul de Coomassie coloidal	
<b>Solución de fijación</b>	Metanol 50%; ácido fosfórico (al 85%) 2%; agua MilliQ c.s.p. 100 ml/gel
<b>Solución de equilibrado</b>	Metanol 33%; sulfato amónico 17%; ácido fosfórico (al 85%) 3%; agua MilliQ c.s.p. 150 ml/gel

#### 3.2.5.5 Espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos

Los geles se escanearon con ayuda de un densitómetro GS-800 (Bio-Rad®). Los *spots* de interés se cortaron manualmente y se colocaron en tubos que contenían 50 µl de agua destilada (Bio-Rad®). Los *spots* fueron enviados a analizar al Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Madrid), donde se realizó la digestión de las proteínas en gel con tripsina, la espectrometría de masas y la búsqueda en bases de datos. A continuación se detallan brevemente los protocolos seguidos en dicho laboratorio.

##### 3.2.5.5.1 Digestión trípica de las proteínas en gel

Las muestras se digirieron de forma automática en un robot Proteineer DP (Bruker Daltonik®) bajo el control del programa dpControl 1.2. Se empleó el protocolo de digestión de Shevchenko y col. (1996) con ligeras variaciones: los fragmentos fueron reducidos con DTT (GE Healthcare®) 10 mM, en bicarbonato amónico (pureza: 99'5%; Sigma®) 50 mM, y alquilados con yodoacetamida (Sigma®) 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo (calidad HPLC; Merck®) y fueron secados en corriente de nitrógeno. A continuación se

añadió a los fragmentos tripsina porcina modificada (calidad de secuenciación; Promega®) a una concentración de 8 ng/μl en bicarbonato amónico 50 mM y se dejó transcurrir la digestión durante 8 h. Por último, se añadió ácido trifluoroacético (pureza: 99'5%; Sigma®) al 0'5% para extraer los péptidos. Los digeridos resultantes se transfirieron a microplacas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en uve (Greiner Bio-One®).

#### **3.2.5.5.2 Espectrometría de masas**

Para el análisis de masas mediante MALDI se mezclaron volúmenes iguales de digerido y de una disolución matriz compuesta por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (Bruker Daltonik®) en acetonitrilo acuoso al 50% y 0'25% de ácido trifluoroacético. La mezcla se depositó en un portamuestras MALDI pretratado AnchorChip de 600 μm (Bruker Daltonik®) y se dejó secar a temperatura ambiente. El análisis de las muestras se realizó de forma automática en un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik®) empleando calibración interna bajo el control del programa flexControl 2.2 (Bruker Daltonik®). En una primera etapa se midieron los espectros de masas MALDI-TOF en el intervalo 800-4.000 Da en modo reflector positivo, a una frecuencia de láser de 50 Hz, y se acumularon 300 espectros individuales. Los espectros MALDI-TOF fueron calibrados internamente, empleando como referencia señales de masa de dos iones provenientes de la autólisis de la tripsina con  $m/z = 842'510$  y  $m/z = 2.211'105$ . En una segunda etapa, se llevó a cabo el análisis de los iones fragmento en modo tándem (TOF/TOF) de aquellos iones precursores cuya relación señal-ruido en el espectro MALDI-TOF superaba un valor umbral. Los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados mediante una compuerta iónica temporal. Los iones fragmento generados mediante descomposición inducida por láser del precursor fueron de nuevo acelerados a 19 kV en la cámara LIFT y analizados en el reflector de iones, acumulándose 1.000 espectros individuales. La calibración para las medidas MALDI-TOF/TOF se realizó con los espectros de los iones fragmento de las señales protonadas de una mezcla de péptidos que cubría el intervalo  $m/z = 800-3.200$ . El análisis automático de los datos de masas se llevó a cabo con el programa flexAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik®). Los espectros MALDI-TOF y TOF/TOF se revisaron manualmente para su readquisición, recalibración o reetiquetado, si fuera preciso, empleando el programa mencionado anteriormente y herramientas informáticas no comerciales.

#### **3.2.5.5.3 Búsqueda en bases de datos**

Los datos de MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF fueron combinados mediante el programa BioTools 3.0 (Bruker Daltonik®) para buscar en una base de datos no redundante



(NCBI<sub>nr</sub>;  $\sim 10^7$  entradas; *Nacional Center for Biotechnology Information*; o SwissProt;  $\sim 5 \times 10^5$  entradas; *Swiss Institute for Bioinformatics*) empleando el programa Mascot (Matrix Science®).

Otros parámetros de búsqueda relevantes fueron: enzima, tripsina; modificaciones fijas, carbamidometilcisteína; se permitió un corte fallido del enzima; tolerancia en péptidos,  $\pm 20$  ppm; tolerancia en MS/MS,  $\pm 0.5$  Da.

### **3.2.6 Detección de proteínas inmunogénicas en la saliva de *P. perniciosus***

#### **3.2.6.1 Obtención de sueros hiperinmunes de ratones BALB/c, cricetos y conejos frente a las proteínas salivales**

Para la obtención de sueros hiperinmunes, se inmunizaron ratones BALB/c (*Mus musculus*), cricetos (*Mesocricetus auratus*) y conejos albinos (*Oryctolagus cuniculus* de raza Nueva Zelanda) a través de la picadura de *P. perniciosus* no infectados procedentes de la colonia de Boadilla (Madrid).

Para la realización de las inmunizaciones, los ratones fueron previamente anestesiados con una mezcla de ketamina (150 mg/kg) y xilazina (15 mg/kg), administrada por vía intraperitoneal. En el caso de los cricetos, estos fueron anestesiados únicamente con ketamina (150 mg/kg) por vía intramuscular. Para los conejos se utilizó una mezcla de ketamina (15 mg/kg) y xilazina (3 mg/kg) por vía intramuscular. En todos los casos cada animal, previamente anestesiado, se introdujo en una jaula con hembras de flebotomos, siguiendo las pautas que se detallan a continuación.

En el caso de los **ratones** BALB/c se llevaron a cabo tres pautas de inmunización:

- *Pauta 1*: Exposición de 10 animales (6 hembras y 4 machos) de 8 semanas de edad a 100 hembras de *P. perniciosus*, una vez por semana durante 10 semanas, para lo que fue preciso utilizar 1.000 hembras de flebotomo por ratón (10.000 hembras en total). El esquema seguido se muestra en la Figura 23.

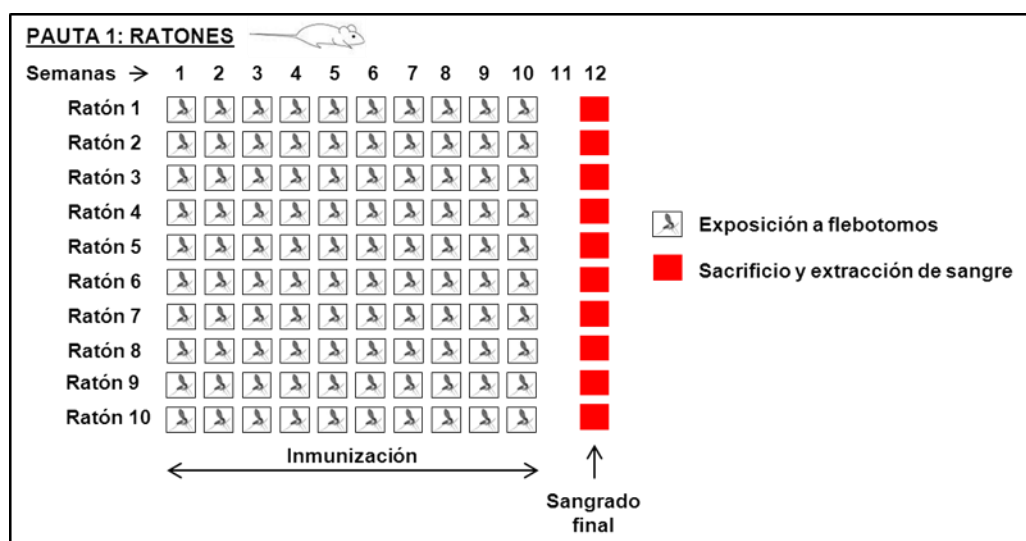


Figura 23. Esquema seguido en la Pauta 1 para la inmunización de ratones BALB/c con la saliva de *P. perniciosus* a través de la picadura.

- Pauta 2: Exposición de 6 hembras de 22 semanas de edad a 100 hembras de *P. perniciosus*, dos veces por semana durante 3 semanas, siendo por tanto necesarias 600 hembras de flebotomo, por ratón (3.600 hembras en total, Figura 24).

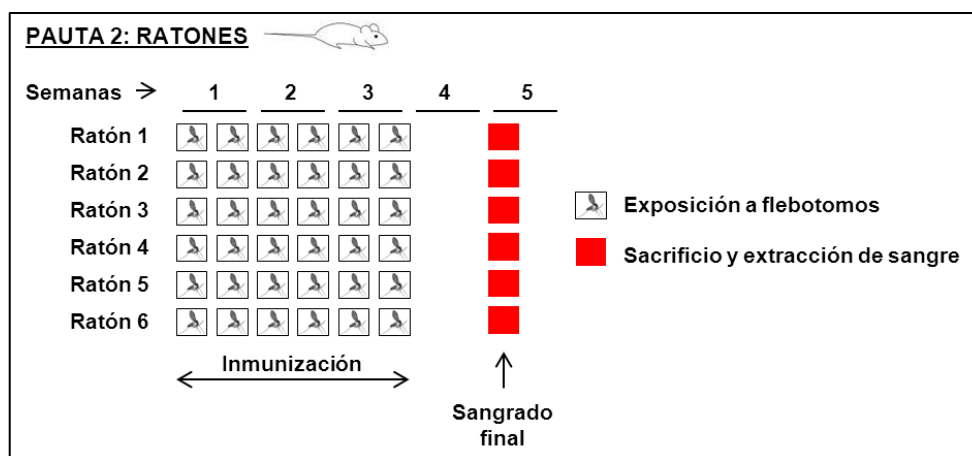
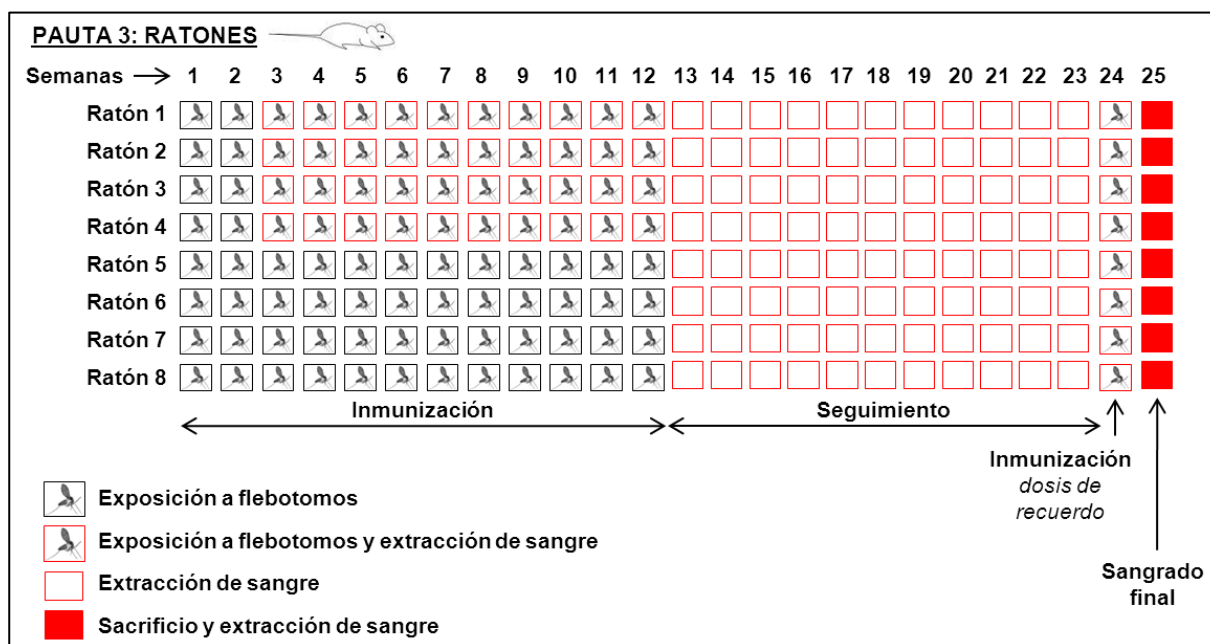


Figura 24. Esquema seguido en la Pauta 2 para la inmunización de ratones BALB/c con la saliva de *P. perniciosus* a través de la picadura.

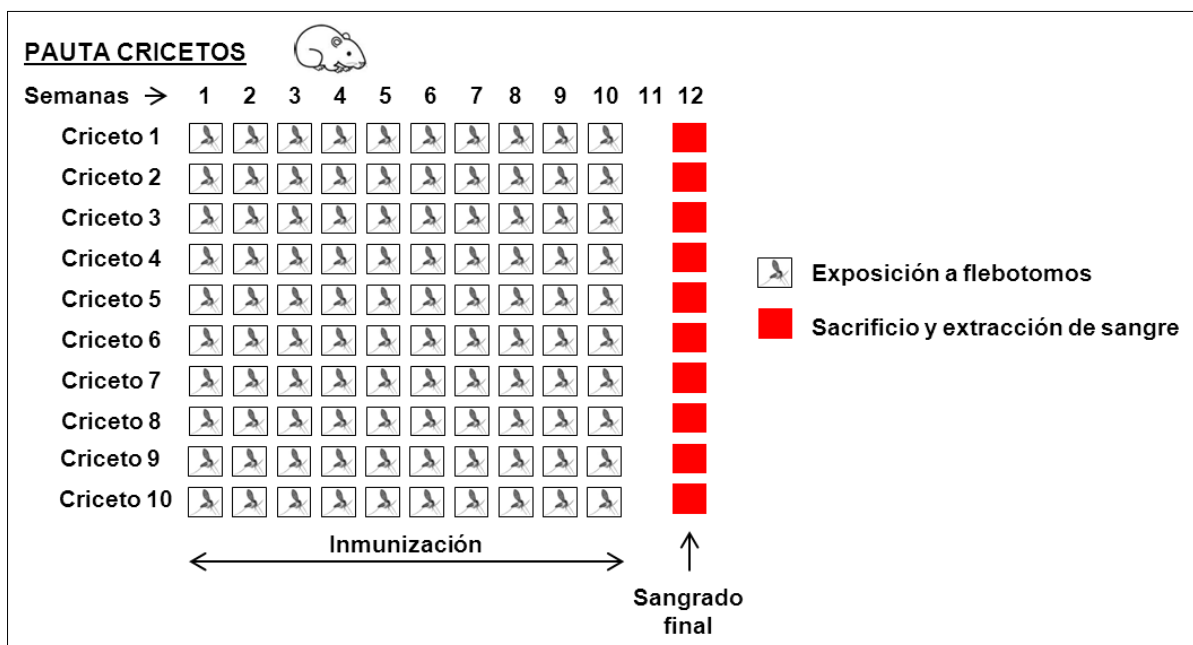
- Pauta 3: Se inmunizaron 8 hembras de 5 semanas de edad durante 12 semanas, exponiendo dichos animales a 150 hembras de flebotomo, una vez por semana. Tras 12 semanas después de la última inmunización, como dosis de recuerdo se realizó una última exposición a los flebotomos (semana 24 del estudio). El esquema de experimentación seguido en este ensayo se muestra en la Figura 25.

Con el fin de estudiar la cinética que siguen los anticuerpos frente a la saliva de *P. perniciosus* se extrajo sangre del plexo retroorbital de los animales, de forma continuada. Concretamente, se obtuvo sangre de los ratones 1-4 durante el periodo de inmunización a partir de tercera semana y, de todos los ratones, en las 12 semanas posteriores (Figura 25). Durante las semanas coincidentes de sangrado e inmunización (semas 3-12), el sangrado se realizó un día antes de la exposición a los flebotomos. Para este experimento se emplearon 15.150 hembras de flebotomos.



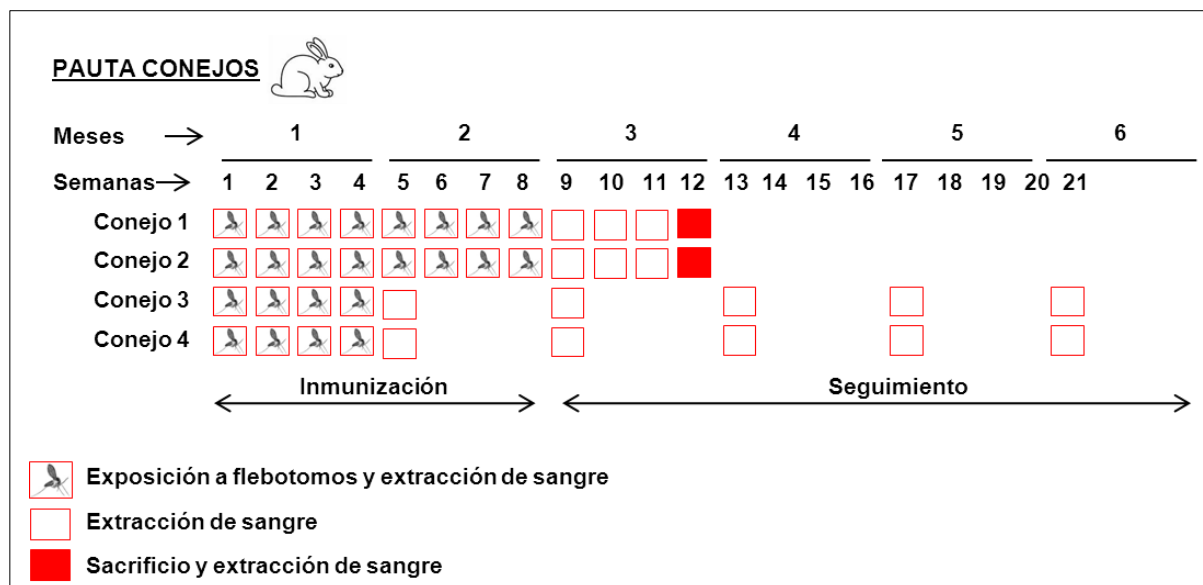
**Figura 25.** Esquema seguido en la Pauta 3 para la inmunización de ratones BALB/c con la saliva de *P. perniciosus* a través de la picadura.

Para la inmunización de los **cricetos**, se utilizaron hembras de 7 semanas de edad que se expusieron a las picaduras de *P. perniciosus* una vez por semana durante 10 semanas (Figura 26), siguiendo la Pauta 1 de inmunización de los ratones (Figura 23). Para ello, se requirieron 6.000 hembras de flebotomos en total.



**Figura 26. Esquema seguido para la inmunización de los cricetos con la saliva de *P. perniciosus* a través de la picadura.**

Se inmunizaron cuatro **conejos** de 2'5 kg de peso, a través de la picadura de *P. perniciosus*. Para ello, cada conejo se expuso semanalmente a 500 hembras de flebotomo. Se inmunizaron 2 conejos durante 8 semanas y se sacrificaron 4 semanas después de la última inmunización (Conejos 1 y 2). Se extrajo sangre semanalmente de la arteria central de la oreja de ambos conejos, de forma continuada, durante todo el experimento. Se inmunizaron otros dos conejos (Conejos 3 y 4), durante 4 semanas, y se extrajo sangre mensualmente durante los 5 meses posteriores a la última inmunización (semanas 5, 9, 13, 17 y 21). De forma paralela se extrajo sangre de dos conejos no inmunizados que se emplearon como controles durante todo el experimento (Conejos 5 y 6). Durante las semanas coincidentes de sangrado e inmunización, el sangrado se realizó un día antes de la exposición a los flebotomos. El esquema de experimentación seguido en este ensayo se muestra en la Figura 27.



**Figura 27. Esquema seguido para la inmunización de los conejos con la saliva de *P. perniciosus* a través de la picadura.**

En todos los casos, tras una hora de exposición a los flebotomos, cada uno de los animales se extrajo de la jaula y se procedió al recuento de las hembras de flebotomo que se habían alimentado de cada animal. Se elaboró así un registro detallado del número de picaduras recibido por cada animal tras cada inmunización. También se anotó el número de hembras alimentadas que no habían sobrevivido al día siguiente de la inmunización, para analizar la posible relación entre la mortalidad y el progreso de las inmunizaciones.

Finalizados los experimentos, se procedió a la eutanasia de todos los animales, para lo que fueron anestesiados, siguiendo la metodología descrita previamente, y se obtuvo sangre por vía intracardiaca. Se depositó la sangre en tubos Aquisel® (Selecta®) que se mantuvieron en reposo durante 2-3 h a temperatura ambiente. El suero se separó del plasma por centrifugación a 4°C, 2.500 rpm, durante 20 min.

### 3.2.6.2 Determinación de los niveles de IgG en el suero de los animales inmunizados frente a la saliva de *P. perniciosus*, mediante la técnica de ELISA

Los niveles de anticuerpos antisaliva se analizaron mediante la técnica de ELISA, siguiendo protocolos diferentes según la finalidad de los experimentos. Un primer protocolo se optimizó para determinar el nivel de anticuerpos antisaliva presente en los sueros de los ratones y cricetos inmunizados experimentalmente con la saliva de los flebotomos, a través de la picadura. Se emplearon glándulas de flebotomos de 4 a 8 días de edad, almacenadas a -70°C en PBS (20 glándulas en viales de 10 µl). El extracto proteico de la saliva se obtuvo mediante sonicación, siguiendo el protocolo descrito previamente (Apartado 3.2.4).

Este extracto salival se utilizó para tapizar placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc®) a razón de una glándula por pocillo en solución carbonato/bicarbonato 0.05 M, pH 9.6, durante toda la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con 1% de BSA en 0.3% de PBS-Tween durante 45 min a 37°C. Tras retirar el exceso de solución bloqueante mediante 5 lavados con PBS-Tween al 0.1%, se incubaron durante toda la noche a 4°C con el lote de sueros de los animales inmunizados en cada caso. Se trabajó con un lote de sueros negativos y positivos para disponer de un mayor volumen de suero homogéneo y, a su vez, disminuir las variaciones interindividuales. Estos sueros se prepararon a una dilución 1:50 en una solución que contenía 0.1% de BSA y 0.1% de PBS-Tween. Posteriormente se retiró, mediante lavado, el exceso de suero y las placas se incubaron durante 45 min a 37°C, con el correspondiente anticuerpo conjugado con peroxidasa anti IgG total de criceto (Southern Biotech®) y anti IgG de ratón (AbD Serotec®) diluidos en 0.1% PBS-Tween a 1:4.000 y 1:500, respectivamente. Tras retirar el exceso de conjugado la reacción se reveló con ABTS en solución citrato/fosfato, siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma®). Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro a 405 nm (ELx800, BioTek®).

La técnica de ELISA se realizó siempre por duplicado y los experimentos se repitieron al menos dos veces. A todos los valores se les restó el valor de absorbancia residual obtenido tras tapizar con antígeno e incubar con la solución de dilución de los sueros solamente.

### **3.2.6.3 Detección de proteínas inmunogénicas mediante *Western blot***

La detección de las proteínas inmunogénicas presentes en la saliva de *P. perniciosus* se realizó mediante técnicas de WB, utilizando los sueros de ratones y cricetos inmunizados experimentalmente a través de la picadura. En todos los casos, se utilizó un lote de sueros de los animales inmunizados de acuerdo a la misma pauta de inmunización (sueros de cricetos n=6 y sueros de ratones pertenecientes a la Pauta 1, n=10, Apartado 3.2.6.1) y otro lote de sueros negativos, en cada caso (n=6).

Tras la electroforesis monodimensional y bidimensional del contenido proteico de 40-150 glándulas (según los Apartados 3.2.4 y 3.2.5), éstas se transfirieron a membranas de PVDF que, tras ser bloqueadas con 3% de BSA (Sigma®) y 2% de reactivo bloqueante ECL (Amersham®), se incubaron durante toda la noche a 4°C con los diferentes lotes de sueros. Tras 3 lavados de 10 min con PBS-Tween al 0.05% y posterior incubación con los correspondientes anticuerpos conjugados con peroxidasa (anti IgG total de criceto de

Southern Biotech® a una dilución 1:3.000 y anti IgG de ratón AbD Serotec® a una dilución 1:1.000) las proteínas antigénicas se visualizaron mediante el sistema DAB (Pierce®), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **3.2.7 Obtención de genes que codifican proteínas inmunogénicas de la saliva de *P. perniciosus***

#### **3.2.7.1 Construcción de una genoteca de expresión con las glándulas salivales de *P. perniciosus* de Madrid**

La genoteca de expresión se construyó a partir de glándulas salivales de hembras de *P. perniciosus* de hasta 1 día de edad procedentes de la colonia de Boadilla del Monte (Madrid) (Apartado 3.1.1). La disección de éstas se realizó en condiciones que aseguraban la integridad del ARNm. Concretamente, las disecciones se llevaron a cabo en PBS libre de RNasas en una primera fase, procediéndose a la eliminación de las alas y patas y a la separación de la cabeza. Posteriormente, las glándulas fueron disecadas en una gota de PBS, en presencia de inhibidores de RNasas (RNasin: 0'1 U/μl, Promega®). Las glándulas recogidas en estas condiciones se almacenaron en 50 μl de RNA*later* (Sigma®). Los materiales de disección (agujas y portaobjetos) fueron previamente tratados con DEPC y autoclavados con el fin de destruir las RNasas. Tras su disección, las glándulas depositadas en RNA*later* fueron procesadas para la extracción de ARNm mediante el *kit* comercial *Micro Fast Track 2.0* (Invitrogen®). Se retrotranscribieron 500 ng de ARNm a ADNc, mediante la enzima transcriptasa inversa. Posteriormente, el conjunto de ADNc se amplificó por PCR utilizando el cebador SMART IV (5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTAC GGCCGGG-3'). El rango del tamaño del conjunto de ADNc se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1'1% (Apartado 3.2.7.6). Una vez comprobado que el conjunto de ADNc poseía un rango de tamaño adecuado, se realizó una clonación dirigida *Sfi*IIAB en el vector λTriplEx2 (Clontech®) previamente tratado con esta misma enzima. Para la construcción de la genoteca se siguieron las indicaciones de los *kits* *SMART cDNA library construction* (Clontech®) y *Gigapack III Gold Packaging Extract* (Agilent Technologies®).

#### **3.2.7.2 Crecimiento y mantenimiento de fagos**

En la propagación de los fagos se utilizó la estirpe bacteriana *E. coli* XL1-Blue, mantenida en placas de LB/agar con tetraciclina (15 μg/ml). Para la preparación del cultivo bacteriano se inocularon 50 ml de medio LB líquido, suplementado con MgSO<sub>4</sub> 10 mM y maltosa al 0'2%, con una colonia procedente de la placa de agar/tetraciclina y se incubó todo durante toda la noche a 37°C en agitación (200 rpm). Las células se recogieron por

centrifugación (5 min, 4.300 rpm), se resuspendieron en 25 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM, se almacenaron a 4°C y fueron reemplazadas semanalmente para asegurar la viabilidad celular. Las células siempre se utilizaron a una  $\text{DO}_{600}$  de 0'5, preparándose la dilución correspondiente en  $\text{MgSO}_4$  10 mM.

Los fagos se diluyeron en el volumen correspondiente de medio de dilución lambda para obtener la cantidad apropiada de halos de lisis en las placas de Petri (1.000 ó 50.000 ufp) y se incubaron con 200 o 500 µl de suspensión bacteriana, dependiendo de la utilización de placas de 90 o 150 mm, respectivamente, durante 15 min a 37°C, para favorecer la adsorción del fago a la membrana bacteriana. Posteriormente, se añadieron a cada vial 3 o 9 ml de agar cobertura, suplementado con  $\text{MgSO}_4$  10 mM, y la mezcla se extendió sobre placas, previamente atemperadas, de LB/agar/ $\text{MgSO}_4$  10 mM de 90 o de 150 mm, respectivamente. Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de los halos de lisis. En la Tabla 10 se especifica la composición de las soluciones empleadas en el crecimiento y mantenimiento de los fagos.

**Tabla 10. Composición de las soluciones requeridas en el mantenimiento de los fagos.**

Soluciones de trabajo	
<b>LB líquido</b>	Triptona 10 g/L; extracto de levadura 5 g/L; NaCl 5 g/L. pH 7'5.
<b>LB sólido</b>	Agar 15 g/L; triptona 10 g/L; extracto de levadura 5 g/L; NaCl 5 g/L. pH 7'5
<b>LB/agar cobertura</b>	Agar 8 g/L; triptona 10 g/L; extracto de levadura 5 g/L; NaCl 5 g/L. pH 7'5
<b>Dilución lambda</b>	NaCl 0'1 M, Tris-HCl pH 7'5 0'035 M; $\text{MgSO}_4$ 0'01 M; gelatina 0'01%.



### **3.2.7.3 Amplificación y titulación de la genoteca de expresión**

Para la amplificación de la genoteca, se incubaron 20 tubos con 500 µl de células *E. coli* XL1-Blue con 20 µl de la genoteca no amplificada (equivalente a 70.000 ufp) durante 20 min a 37°C. Tras la incubación se añadieron 9 ml de agar cobertura y el contenido de cada tubo se extendió homogéneamente sobre una placa LB/agar/MgSO<sub>4</sub> de 150 mm y se incubó durante toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente, tras confirmar la lisis confluyente de las ufp, se incubó cada placa, primero con 12 ml de medio de dilución lambda toda la noche a 4°C y, posteriormente, a temperatura ambiente durante 1 h, en agitación suave. Se recogió la solución, se añadieron 10 ml de cloroformo y se clarificó por centrifugación a 5.500 rpm, durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se repartió en alícuotas y se conservó a 4°C en presencia de cloroformo (0'3%).

Para conocer el título de las genotecas no amplificadas y amplificada, se prepararon diferentes diluciones de las mismas que fueron utilizadas para infectar las células bacterianas. El recuento de las ufp permitió calcular el título de la genoteca, expresado como ufp/ml. Además, el recuento de ufp blancas y azules crecidas en presencia de 75 µl de IPTG 0'1 M y 75 µl de X-Gal 0'1 M permitió calcular el porcentaje de recombinantes.

### **3.2.7.4 Aislamiento de fagos al azar**

Los halos de lisis de los fagos recombinantes procedentes de placas, crecidas en presencia de IPTG y X-Gal se aislaron con una pipeta Pasteur y se depositaron en 500 µl de solución de dilución lambda. Se incubaron a 37°C durante una hora en agitación y se retiraron 100 µl para el análisis por PCR. El volumen restante se conservó a 4°C, en presencia de 0'3% de cloroformo.

### **3.2.7.5 Determinación del tamaño del inserto en los fagos recombinantes mediante PCR**

El ADN molde se preparó hirviendo durante 10 min una alícuota con 100 µl de fago en solución de dilución lambda, separada tras el aislamiento de los fagos, según lo especificado en el apartado anterior. Posteriormente, se clarifico por centrifugación durante 5 min a máxima velocidad en microcentrífuga, y se añadieron 40 µl del sobrenadante a la mezcla de amplificación, compuesta por 2 µl de mezcla de dNTPs (Roche®) en una concentración final de 0'2 mM de cada dNTP, 10 µl de solución tampón 10X (Biotools®), 2 µl de Taq polimerasa (1 U/µl, Biotools®), 1 µl de cada cebador preparado a una dilución de 10 µM (5TriplEx2Seq y 3TriplEx2Seq, cuyas secuencias están anotadas en la Tabla 13).

Finalmente, se añadió agua destilada estéril hasta completar un volumen de 100 µl. Las condiciones de la amplificación quedan reflejadas en la Tabla 11.

**Tabla 11. Condiciones de amplificación de ADNc a partir de los fagos recombinantes**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	30
Anillamiento	50	30 s	
Polimerización	72	2 min	
Extensión final	72	7 min	1

### 3.2.7.6 Electroforesis de ácidos nucleicos

La separación de los ácidos nucleicos de acuerdo a su peso molecular se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa D-1 (Conda<sup>®</sup>, Madrid, España) al 1% en solución TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Para la visualización del ADN se añadió bromuro de etidio a la solución de agarosa a una concentración final de 0'8 µg/ml. Como tampón de carga se utilizó una solución compuesta por azul de bromofenol (0'25%), xilenocianol FF (0'25%), 30% glicerol y agua. El peso molecular de los fragmentos separados se estimó por comparación con patrones de peso molecular conocido. Se emplearon los marcadores de 100 pb de rango 100-1.000 pb y de 1 Kb de rango 250-10.000 pb (Biotools<sup>®</sup>). La electroforesis se realizó en cubetas Bio-Rad<sup>®</sup> a voltaje constante y las bandas se observaron mediante exposición a luz ultravioleta en un transiluminador conectado a un sistema de captura e impresión de imágenes Gel Doc 2000 (Bio-Rad<sup>®</sup>), usando el programa *Quantity One* 4.4.0 (Bio-Rad<sup>®</sup>).

### 3.2.7.7 Conversión del fago λTriplEx2 a plásmido pTriplEx2

La conversión de fagos a plásmidos se realizó vía recombinación mediada por Cre-lox. La actividad Cre recombinasa la proporcionó la cepa *E.coli* BM25.8 que, mediante la escisión y recircularización *in vivo*, da lugar al correspondiente plásmido. Se inocularon 10 ml de medio líquido LB con una colonia bacteriana BM25.8, procedente de un cultivo en placa LB/agar, suplementado con kanamicina (50 µg/ml) y cloranfenicol (35 µg/ml). Se cultivaron durante toda la noche a 31°C en agitación suave (150 rpm) hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub>=1'1, momento en el que se incorporaron 100 µl de MgCl<sub>2</sub> 1 M. Para la conversión se combinaron 200 µl del cultivo bacteriano con 150 µl del fago aislado en

solución de dilución lambda y dicha mezcla se incubó a 31°C durante 30 min, sin agitación. Posteriormente se añadieron 400 µl de medio LB líquido y se incubaron a 31°C durante una hora, en agitación (225 rpm). Transcurrido el tiempo de incubación se extendieron 10 µl de dicho cultivo sobre placas de LB/agar suplementadas con carbenicilina (50 µg/ml) y se incubaron a 31°C durante toda la noche. Los clones obtenidos se analizaron por PCR para comprobar si eran recombinantes, siguiendo la metodología descrita a continuación.

### 3.2.7.8 PCR de los clones recombinantes

Con el fin de asegurar que los clones aislados en las placas de LB/agar eran recombinantes, se procedió a su amplificación por PCR y determinación del tamaño de la banda amplificada. Para ello, cada colonia bacteriana se depositó en 10 µl de agua destilada estéril, y de ahí se tomó 1 µl como ADN molde. La mezcla de reacción contenía 1 µl de mezcla de dNTP (Roche®) en una concentración final de 0.2 mM de cada dNTP, 5 µl de solución tampón 10X (Biotools®), 1 µl de Taq polimerasa (1 U/µl, Biotools®), 1 µl de cada cebador preparado a una dilución de 200 ng/µl (TriplEx 5' Seq y TriplEx3' Seq, cuyas secuencias están anotadas en la Tabla 13) y agua destilada estéril hasta completar un volumen final de 50 µl. Los parámetros que se utilizaron en esta amplificación se describen en la Tabla 12.

**Tabla 12. Condiciones de amplificación de PCR de los clones bacterianos recombinantes.**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Repeticiones</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	94	5 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94	30 s	30
<b>Anillamiento</b>	55	30 s	
<b>Polimerización</b>	72	2 min	
<b>Extensión final</b>	72	5 min	1

### 3.2.7.9 Aislamiento de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se aisló empleando el *kit* comercial *QIAprep Spin Miniprep kit* (Qiagen®) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ADN plasmídico resultante fue eluido en 50 µl de agua destilada estéril.

### **3.2.7.10 Cuantificación de ácidos nucleicos**

La concentración de ácidos nucleicos se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. La medida de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies®) utilizando como blanco la solución en la que los ácidos nucleicos estaban disueltos. El grado de pureza de las muestras se determinó mediante el cociente  $A_{260}/A_{280}$ , considerándose adecuado cuando los valores estaban comprendidos entre 1'8 y 2.

### **3.2.7.11 Secuenciación de ADN**

Los análisis de secuenciación se llevaron a cabo según el método enzimático de terminación de cadena o método dideoxi de Sanger y col. (1977). La muestra se sometió a una amplificación previa en un volumen final de 10  $\mu$ l, en la que se emplearon de 100 a 200 ng de ADN, un único cebador por reacción a una concentración de 3'2 pmoles/ $\mu$ l, y 3  $\mu$ l de mezcla de reacción del *kit* comercial *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (PE Biosystems®).

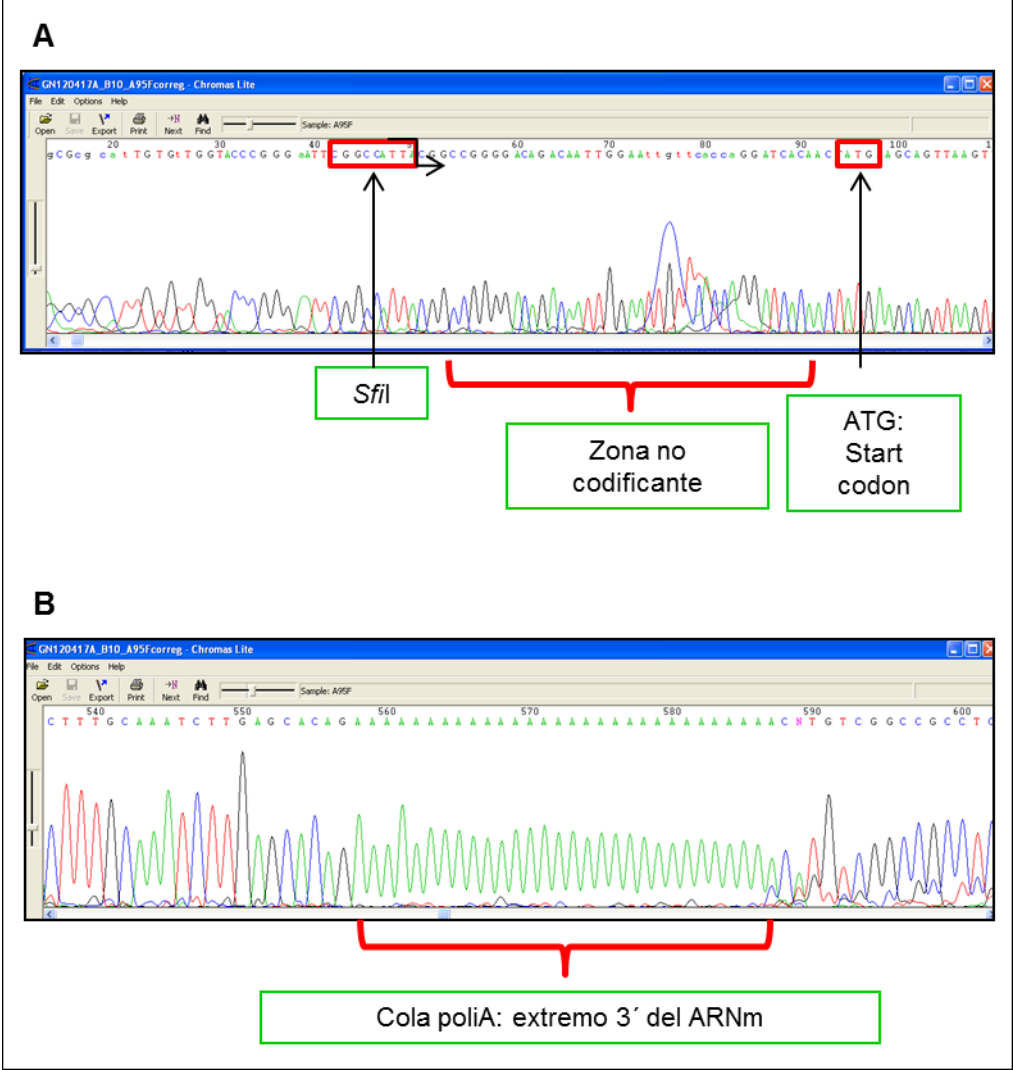
Las secuenciaciones se realizaron empleando cebadores universales de los vectores. En algunos casos se requirió el uso de cebadores específicos de cada gen para poder avanzar en la secuenciación. Todos los cebadores utilizados en este trabajo fueron suministrados por la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII). Las secuencias de los cebadores empleados para la secuenciación se exponen en las Tablas 13 y 16.

**Tabla 13. Cebadores empleados en la secuenciación**

Nombre	Secuencia	Observaciones
<b>5 TriplEx LD</b>	5'- CTCGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT -3'	Secuenciación de genes en pTriplEx2
<b>3 TriplEx LD</b>	5'- ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCC -3'	
<b>PT2R1</b>	5'- CTCTTCGCTATTACGCCAGCTG -3'	
<b>M13 F</b>	5'- GTAAAACGACGGCCAGT -3'	Secuenciación de genes en pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup>
<b>M13 R</b>	5'- CAGGAAACAGCTATGACC -3'	
<b>SP03B intF</b>	5'- AGCCGGAAGCAGTACGAAGC -3'	Cebadores internos para completar la secuenciación de SP03B en pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup>
<b>SP03B intR</b>	5'- TCAATCCGTCCGACGTCCGC -3'	
<b>SP06 intF</b>	5'- AGGAAATGAGATCTTCTACCGC -3'	Cebadores internos para completar la secuenciación de SP06 en pTriplEx2
<b>SP06 intR</b>	5'- TGAATTTCTTAGCGCGGTGC -3'	
<b>pQE F</b>	5'- CCCGAAAAGTGCCACCTG -3'	Comprobación de la orientación del inserto en vectores de expresión
<b>pGEX F</b>	5'- GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG -3'	

Las muestras amplificadas se remitieron a la Unidad de Genómica. La lectura de cada secuencia se realizó en un secuenciador ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

Los clones recombinantes pTriplEx2, aislados de la genoteca que presentaban un tamaño adecuado se secuenciaron para poder conocer la identidad de los insertos, mediante una búsqueda de homología de secuencias nucleotídicas a través del programa informático BLAST. Para ello, los electroferogramas se inspeccionaron manualmente, lo que permitió localizar la secuencia codificante entre el sitio de restricción del vector *SfiI* en el extremo 5' y la cola de poliadeninas en el extremo 3' (Figura 28).



**Figura 28.** Detalle de localización manual de la secuencia de ADNc en el electroferograma entre A) el codón de inicio en el extremo 5' y B) la cola de poliadeninas en el extremo 3'.

### 3.2.7.12 Amplificación de genes que codifican las proteínas salivales

Los genes de interés fueron amplificados de acuerdo a dos metodologías. Algunos genes se obtuvieron amplificando los CDS a partir de los plásmidos pTriplEx2 que contenían los insertos adecuados, determinados por secuenciación (Apartado 3.2.7.12.1). Sin embargo, otras moléculas de interés no se encontraron entre los fagos aislados al azar, por lo que se procedió a la amplificación de los CDS directamente, usando la genoteca como molde de ADN (Apartado 3.2.7.12.2).

### 3.2.7.12.1 Amplificación de genes de interés a partir de ADN plasmídico pTriplEx2 recombinante

Los genes que codifican algunas de las proteínas salivales de interés fueron amplificados por PCR a partir de los plásmidos recombinantes pTriplEx2 que contenían los genes codificantes de estas proteínas, utilizando la enzima polimerasa de alta fidelidad *PfuTurbo*<sup>®</sup> *Hotstart* (Stratagene<sup>®</sup>) que presenta una alta eficiencia de polimerización y una muy baja tasa de introducción de mutaciones.

La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 50 µl y consistió en 5 µl de tampón de reacción *Pfu* 10 x (Stratagene<sup>®</sup>), ADN plasmídico (100-200 ng), 1 µl de dNTPs (Biotools<sup>®</sup>, 10 mM, que corresponde a una concentración final de 250 µM de cada nucleótido), 200 ng de cada cebador (5'TriplExSeq y 3'TriplExSeq, cuyas secuencias se detallan en la Tabla 13), 3 µl DMSO (6% concentración final), 1 µl de polimerasa *PfuTurbo*<sup>®</sup> *Hotstart* (2'5 U/µl, Stratagene<sup>®</sup>) y agua destilada, hasta completar un volumen de 50 µl. Las condiciones de la PCR se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14. Condiciones de amplificación de los genes a partir del correspondiente plásmido recombinante pTriplEx2.**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Repeticiones</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	5 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95	1 min	
<b>Anillamiento</b>	58	1 min	15
<b>Polimerización</b>	72	3 min	
<b>Extensión final</b>	72	10 min	1

Tras la amplificación, el producto de PCR se sometió a un ciclo de 5 min a 95°C tras el cual se adicionó 1 µl de polimerasa *Ampli Taq* (5 U/µl, Applied Biosystems<sup>®</sup>), dejándose actuar la enzima durante 15 min a 70°C. Este paso se realizó para introducir un nucleótido de adenina en los extremos 5', necesario para la posterior subclonación en el vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>).

### 3.2.7.12.2 Amplificación de otros genes de interés a partir de la genoteca

Los genes que codifican otras proteínas de interés, no encontrados al analizar al azar los clones de la genoteca, se aislaron mediante una amplificación con cebadores directos específicos de cada gen y un cebador universal del vector (3TriplEx Seq: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3') utilizando como molde de ADN la genoteca amplificada. Para ello, se preparó una dilución 1:10 de la genoteca en agua destilada estéril y se hirvió durante 10 min, se clarificó por centrifugación y se tomaron 40 µl como molde de la reacción de PCR. Se siguieron las condiciones descritas en el Apartado 3.2.7.5. Los cebadores directos específicos empleados en esta amplificación se detallan en la Tabla 15.

**Tabla 15. Cebadores utilizados en la amplificación de los genes a partir de la genoteca.**

Gen amplificado	Nombre del cebador	Secuencia
<b>SP01</b>	SP01 Pper	5'- ATGATATTGAAATTGTGCGC-3'
<b>SP03B</b>	SP03B Pper	5'-ATCTTTCTGTGCCTAATTGC-3'
<b>SP08</b>	SP08 Pper	5'-CCATCGATGGTGAAATACTTC-3'

Tras la amplificación, se introdujo un nucleótido de adenina en los extremos 5' del producto de PCR para permitir la posterior subclonación en el vector pCR®4-TOPO® (Invitrogen®) de acuerdo con el protocolo descrito previamente (Apartado 3.2.7.12.1).

### 3.2.7.12.3 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

En todos los casos los productos de PCR se visualizaron en un transiluminador, se cortaron manualmente con un bisturí estéril y posteriormente se purificaron, utilizando el *kit* comercial *QIAquick® Gel extraction* (Qiagen®). El ADN se eluyó en 30 µl de agua destilada estéril.

### 3.2.7.13 Subclonación de ADNc en vectores

#### 3.2.7.13.1 Subclonación de fragmentos de amplificación en el vector pCR®4-TOPO®

El vector pCR®4-TOPO® (Invitrogen®) se utilizó para subclonar los productos de PCR, tanto de los genes amplificados a partir de ADN plasmídico como aquellos amplificados directamente de la genoteca. La subclonación se realizó a razón molar de 1:3 (vector/inserto) siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Invitrogen®). Posteriormente, se transformaron células TOP10 químicamente competentes con 2 µl del



producto de ligación, mediante choque térmico (42°C, 30 s; 4°C, 2 min.). Tras el crecimiento de las bacterias en 250 µl de medio SOC durante 1 h a 37°C, se seleccionaron los clones recombinantes en placas de medio LB/agar suplementadas con ampicilina (100 µg/ml). Los clones se analizaron por PCR (Apartado 3.2.7.8), empleando T3 y T7 como cebadores (T3: 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3', T7: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'). En todos los casos se seleccionó un clon recombinante que fue secuenciado (Apartado 3.2.7.11) para continuar con los experimentos de subclonación en vectores de expresión.

#### **3.2.7.13.2 Subclonación en vectores de expresión procariota**

Para llevar a cabo la subclonación dirigida en los vectores de expresión procariota se introdujeron los sitios de restricción adecuados en los extremos de los genes, mediante PCR, siguiéndose la metodología explicada en el Apartado 0. Las parejas de cebadores empleadas en la amplificación de cada gen se muestran en la Tabla 16. Como material de partida se utilizaron 50 ng de ADN molde de los plásmidos recombinantes pCR®4-TOPO® conteniendo los genes codificantes de las proteínas salivales,

Con el fin de comprobar la integridad de los sitios de restricción y que la polimerasa no había introducido ninguna mutación durante la amplificación, se secuenciaron ambas hebras de los clones recombinantes pCR®4-TOPO® que contenían la secuencia codificante de las proteínas, tras la introducción de los sitios de restricción.

**Tabla 16. Parejas de cebadores empleadas en la amplificación de los genes para la introducción de los sitios de restricción\*.**

Gen amplificado	Nombre cebador	Secuencia
<b>SP01</b>	SP01FSaI	5'- <u>GTCGAC</u> ATGATATTGAAATTGTGC -3'
	SP01RSaI	5'- <u>GTCGAC</u> TTATTTTTTAATGCCTG -3'
<b>SP01B</b>	SP01BFSaI	5'- <u>GTCGAC</u> ATGATATTGTTGAAATTG -3'
	SP01BRSaI	5'- <u>GTCGAC</u> TTACTTAATTCCTTTGGG -3'
<b>SP03B</b>	SP03BFSaI	5'- <u>GTCGAC</u> ATGAAGATCTTTCTG -3'
	SP03BRSaI	5'- <u>GTCGAC</u> TTATGGCTTGCGG -3'
<b>SP04</b>	SP04FSaI	5'- GAGAGAG <u>GTCGAC</u> ATGAATACCTTATTG -3'
	SP04RSaI	5'- GAGAGAG <u>GTCGAC</u> CTAATAATTTGTTAATG -3'
<b>SP04B</b>	SP04BFSaI	5'- GAGAGAG <u>GTCGAC</u> ATGAACGCTTTATTC -3'
	SP04BRSaI	5'- GAGAGAG <u>GTCGAC</u> TTAATATACGGC -3'
<b>SP08</b>	SP08FBamHI	5'- <u>GGATCC</u> ATGATCGTGAAGG -3'
	SP08RSaI	5'- <u>GTCGAC</u> TCAGTTCAAACGG -3'

\*Los sitios de restricción aparecen subrayados en la secuencia.

Los genes se aislaron de los plásmidos recombinantes pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> por digestión con las endonucleasas de restricción durante 3 h a 37°C (Tabla 16). Para permitir la clonación dirigida, los vectores pQE31 y pGEX4T3 se digirieron con las mismas enzimas de restricción. La subclonación se realizó a razón molar de 1:3 (vector/inserto) en un volumen final de 10 µl, en presencia de la enzima ligasa del fago T4 y su tampón correspondiente (New England Biolabs<sup>®</sup>). Esta reacción tuvo lugar a 16°C durante toda la noche. Posteriormente se transformaron 2 µl de la mezcla de ligación en 100 µl de células competentes XL1-Blue, mediante choque térmico (42°C, 45 s; 4°C, 2 min). Esta cepa bacteriana se utilizó en el mantenimiento y propagación de los plásmidos. Tras comprobar, mediante la PCR de clones recombinantes (Apartado 3.2.7.8), que la orientación del inserto era la correcta, el ADN plasmídico se aisló (Apartado 3.2.7.9) y se transformó de nuevo en células competentes de las cepas de *E. coli* apropiadas para la expresión proteica (Apartado 3.1.3). La transformación de los vectores recombinantes pQE31 y pGEX4T3 en células M15 y BL21, respectivamente, se realizó de la forma descrita anteriormente. Sin embargo, la transformación de los plásmidos pGEX4T3 recombinantes en las células *ArcticExpress* se llevó a cabo siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial (Agilent<sup>®</sup>). Asimismo, se secuenciaron los clones recombinantes pQE31 y pGEX4T3 para confirmar la correcta orientación de los insertos clonados en los vectores de expresión. En la Figura 29 se muestra el esquema seguido para la subclonación de las moléculas de interés.

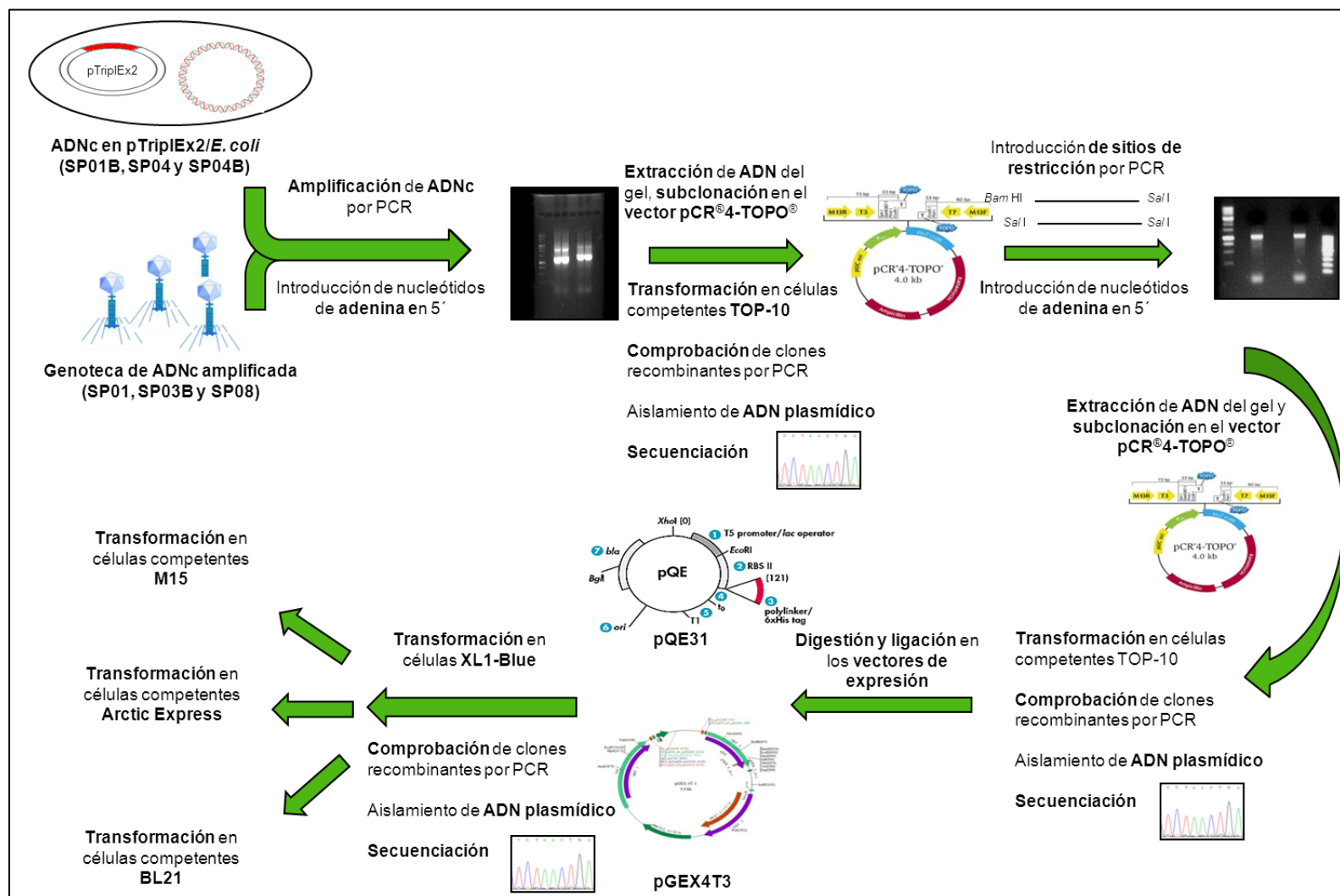


Figura 29. Esquema de la subclonación de los genes codificantes de las proteínas salivales de *P. perniciosus*.

#### **3.2.7.14 Análisis bioinformático**

Con el fin de caracterizar las moléculas de interés, las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas fueron estudiadas mediante herramientas bioinformáticas.

El programa Chromas Lite se empleó en la visualización de los electroferogramas obtenidos tras la secuenciación de ADN, manualmente inspeccionados y editados.

El programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) permitió analizar la identidad de los clones presentes en la genoteca de expresión mediante una comparación de las secuencias nucleotídicas, empleando la base de datos no redundante de GenBank.

El paquete bioinformático DNASTar (Lasergene) fue utilizado en el análisis de las secuencias, tanto nucleotídicas como aminoacídicas. Concretamente, los alineamientos de secuencias nucleotídicas se realizaron con ayuda del programa Seqman y Clustal W. En el caso de las secuencias aminoacídicas, las secuencias sin péptido señal se alinearon con Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). El programa Boxshade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) se empleó en la generación de imágenes de los alineamientos. El fondo en negro indica identidad de al menos el 80% de los aminoácidos. Los residuos no conservados aparecen como texto negro sobre un fondo blanco. El sombreado gris representa los residuos similares pero no idénticos.

A través del programa Protean (DNASTar) se analizaron diferentes características de las proteínas, utilizando diversos algoritmos. Concretamente, el modelo de Jameson-Wolf se empleó en la determinación de la antigenicidad de las proteínas. En estos análisis, los valores positivos de índice antigénico se corresponden con la presencia de regiones antigénicas. Además, el algoritmo Kyte-Doolittle nos permitió conocer el modelo de predicción del patrón de hidrofobicidad de las proteínas. Dicho algoritmo se muestra en forma de gráfica, de tal manera que valores positivos corresponden a regiones aminoacídicas hidrofílicas y valores negativos indican regiones hidrofóbicas. Por último, se empleó el método de Garnier-Robson en la predicción de la estructura secundaria (regiones alfa y beta) de las proteínas estudiadas.

El programa Signal P 3.0 estimó la presencia o ausencia de péptido señal en las secuencias proteicas así como el punto de corte más probable para la actuación de la peptidasa. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

El programa NetPhos 2.0 se usó en la predicción de fosforilación de residuos tirosina, serina y treonina. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

Para la predicción de los sitios de glicosilación en N y O se utilizaron los programas NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) y NetOGlyc 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), respectivamente. La N-glicosilación tiene lugar en residuos serina o treonina, tras una asparragina y otro aminoácido (Asn-Xaa-Ser/Thr). La O-glicosilación puede producirse en residuos de serina o treonina (Ser/Thr).

### **3.2.8 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes de la saliva de *P. perniciosus***

#### **3.2.8.1 Expresión de las proteínas recombinantes**

Para la expresión de las proteínas de fusión se partió de los clones recombinantes M15, BL21 y *ArcticExpress*. Las condiciones más favorables para el crecimiento de los cultivos e inducción de la expresión se determinaron tras una puesta a punto inicial con cultivos de 5 ml. Se preparó un precultivo partiendo de una colonia bacteriana y 50 ml de medio LB/ampicilina (200 µg/ml) en un Erlenmeyer de 500 ml y se incubó toda la noche a 30°C y 200 rpm, para conseguir una aireación óptima. Al día siguiente, se tomó un volumen de 2 ml del precultivo y se dispuso en 200 ml de LB/ampicilina (200 µg/ml) en un Erlenmeyer de 2 L. Los cultivos se incubaron a 37°C, hasta alcanzar un DO<sub>600</sub> de 0'6 aproximadamente, momento en el cual fueron inducidos con IPTG a una concentración final de 1 mM y mantenidos en crecimiento a 37°C durante 3 h. Finalmente las células se recogieron por centrifugación (3.000 rpm, 30 min). En todos los casos se tomaron alícuotas antes y después de añadir IPTG para su posterior análisis por SDS-PAGE.

Las proteínas recombinantes expresadas en las células *ArcticExpress* se expresaron a 4°C durante 24 h en presencia de IPTG 1 mM, siguiendo las recomendaciones de expresión de las células *ArcticExpress* (Agilent®).

### 3.2.8.2 Purificación de las proteínas recombinantes

#### 3.2.8.2.1 Cromatografía de afinidad

**La cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC)**, se basa en la alta afinidad que presenta la resina, compuesta por agarosa Ni-NTA (Qiagen®), por los residuos de histidina fusionados a las proteínas recombinantes. Se empleó para la purificación de las proteínas recombinantes expresadas en los plásmidos pQE31. Al pasar la muestra por la columna, se produce una fuerte interacción entre el níquel de la resina y los anillos imidazólicos de las histidinas, quedando las proteínas retenidas. Tras la eliminación de las impurezas mediante lavados, las proteínas son eluidas de las columnas en una solución a bajo pH para romper las uniones resina-proteína, liberando las proteínas purificadas. Para ello, las células procedentes de un cultivo inducido se lisaron en la solución A (1 ml por cada 10 ml de cultivo) durante 1 h en rotación, a temperatura ambiente. El lisado se separó de los restos celulares por centrifugación (3.000 rpm, 30 min) y el sobrenadante se purificó por gravedad a través de columnas de 5 ml (Qiagen®). Las columnas, que habían sido empaquetadas previamente añadiendo 1'5 ml de resina Superflow (Qiagen®), se lavaron con 2 volúmenes de PBS para eliminar el etanol de la resina y se equilibraron con 5 volúmenes de solución B. Una vez retenida la proteína en la resina, se realizaron dos lavados con 4 ml de solución C y a continuación se llevaron a cabo 10 eluidos con 1 ml de solución E. La composición exacta de las soluciones que se utilizaron en la purificación se muestra en la Tabla 17.

**Tabla 17. Purificación de las proteínas recombinantes en el vector pQE31.**

Soluciones empleadas en la purificación de las proteínas	
A	Clorhidrato de guanidinio 6 M; TrisHCl 10 mM; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM; pH 8.
B	Urea 8 M; TrisHCl 10 mM; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM; pH 8.
C	Urea 8 M; TrisHCl 10 mM; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM; pH 6'3.
E	Urea 8 M; TrisHCl 10 mM; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM; pH 4'5.

**La cromatografía de afinidad en columna de sefarosa-glutationa** se empleó en la purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST (plásmido pGEX4T3). Se lisaron los cultivos de células BL21 y *ArcticExpress*, inducidos con ayuda de solución B-PER (Thermo Scientific®) en presencia de lisozima (200 µg/ml). El lisado se separó de los restos celulares por centrifugación y se hizo pasar por gravedad a través de columnas, previamente empaquetadas con 1'5 ml de resina de sefarosa-glutationa (GE Healthcare®).

La proteína recombinante GST se une específicamente a los residuos glutatona de la resina, quedando retenida en la columna. Tras tres lavados con PBS enfriado, se eluyó la proteína recombinante, haciendo pasar por la columna 10 ml de una solución compuesta por Tris-HCl 50 mM y glutatona reducida 10 mM, que se une a la resina con elevada afinidad y desplaza la proteína recombinante, que fue recogida en el eluido.

#### **3.2.8.2.2 Escisión de bandas proteicas de geles de poliacrilamida**

El extracto celular procedente de 50 ml de cultivo inducido se resuspendió en 250  $\mu$ l de tampón de muestra Laemmli y, tras la separación proteica mediante SDS-PAGE en geles de pocillo único de 12% de acrilamida (Apartado 3.2.4.1), se procedió a cortar la banda correspondiente a la proteína de fusión con un bisturí estéril. La banda se trituró con un mortero en PBS frío y se mantuvo en contacto con dicha solución toda la noche a 4°C en agitación, para favorecer la extracción proteica. A la mañana siguiente, el sobrenadante se separó de las partículas de acrilamida por centrifugación a 8.000 rpm a 4°C durante 15 min.

#### **3.2.8.3 Análisis y caracterización de las proteínas recombinantes**

##### **3.2.8.3.1 Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bio-Rad®) (Bradford, 1976). Se diluyeron las muestras y los patrones de BSA en 800  $\mu$ l de PBS y se incubaron durante 5 min con 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford. Tras la medida de la absorbancia a 595 nm se preparó una curva patrón con los datos obtenidos de los patrones de BSA, sobre la que se extrapolaron los datos de absorbancia de las muestras.

##### **3.2.8.3.2 Tinción de las proteínas recombinantes**

Las proteínas se visualizaron mediante tinción de los geles con azul de Coomassie brillante R-250 (Bio-Rad®) al 0.25% (p/v); metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 10 min. Los geles se destiñeron en una solución de metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) en agitación, hasta que las bandas resultaron claramente visibles.

##### **3.2.8.3.3 Detección de residuos de histidina mediante *Western blot***

La presencia de residuos de histidina se verificó mediante inmunodetección por WB, según el Apartado 3.2.6.3, usando anticuerpos anti-RGS-His obtenidos en ratón a una

dilución 1:3.000 (Qiagen®) en combinación con el anticuerpo conjugado a peroxidasa anti IgG de ratón (1:500, AbD Serotec®).

#### **3.2.8.3.4 Renaturalización de las proteínas**

Las proteínas se renaturalizaron mediante la eliminación de sustancias que pudieran interferir en el correcto plegamiento de las proteínas, tales como sales, urea y glutatona reducida. Este proceso se llevó a cabo a través de diálisis en dispositivos de valor nominal de corte de 7 kDa (Pierce®). Como las muestras proteicas habían sido eluidas a pH 4'5 y se encontraban en una solución de urea 8 M, primeramente se dializaron toda la noche frente a 1'5 litros de la solución 1, cuya concentración de urea es 6 M. Posteriormente se fueron añadiendo 250 ml de solución 2 cada 8 h. La diálisis se realizó a 4°C y se prolongó durante cuatro días con el fin de reducir paulatinamente la concentración de urea y llevar el pH a valores próximos a 7 y así facilitar un correcto plegamiento de la proteína. Finalmente las muestras se dializaron durante toda la noche frente a PBS 1X. La GST Se dializó frente a PBS durante toda la noche a 4°C para retirar la glutatona reducida. La composición detallada de las soluciones empleadas en la diálisis está reflejada en la Tabla 18.

**Tabla 18. Diálisis de las proteínas recombinantes.**

Soluciones utilizadas	
1	Urea 6 M, TrisHCl 10 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM; pH 4'5.
2	TrisHCl 10 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM; pH 7.
PBS 1X	NaCl 137 mM, KCl 2'7 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM, KHPO <sub>4</sub> 2 mM; pH 7'4.

#### **3.2.8.3.5 Concentración de muestras proteicas**

Las proteínas recombinantes se concentraron mediante el uso de una bomba peristáltica de concentración de 50 ml, 10 ml y 1 ml de Amicon (Millipore®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron membranas de ultrafiltración de celulosa regenerada con un valor nominal de corte de 10 kDa (Millipore®).

### **3.2.9 Evaluación de las proteínas recombinantes de la saliva como marcadores de la exposición a la picadura de los flebotomos**

Este estudio se llevó a cabo en el LBV (CUNI), República Checa, gracias a una beca para la realización de una estancia de tres meses de duración concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad.



Para llevar a cabo los experimentos realizados durante esta fase, se emplearon las técnicas de ELISA y *Western blot* que este laboratorio maneja rutinariamente, así como el extracto salival de *P. perniciosus* procedentes de la colonia de Murcia (Apartado 3.1.1). Los sueros de ratones y perros, procedentes de dicho laboratorio, se detallan a continuación.

### **3.2.9.1 Sueros**

En la evaluación de las proteínas recombinantes de la saliva se emplearon sueros hiperinmunes de 3 ratones sin pelo *skh* obtenidos por exposición experimental a la picadura de *P. perniciosus* 4, 9 y 25 veces, respectivamente. Como controles negativos se utilizaron sueros de 3 ratones no inmunizados. Además, se emplearon 18 sueros de perros de raza Beagle, experimentalmente expuestos a la saliva de *P. perniciosus* (Vlková y col., 2011). Estos sueros habían sido clasificados en 3 grupos, en función del rango de exposición de los perros a las picaduras: un grupo de 6 animales no expuestos y un segundo y tercer grupo, formados por 6 animales cada uno, que se correspondían con una baja y alta exposición a las picaduras de los flebotomos, respectivamente.

### **3.2.9.2 Evaluación de las proteínas recombinantes mediante ELISA**

Para la determinación de los niveles de anticuerpos IgG antisaliva en sueros de ratones y perros se disecaron glándulas salivales de hembras de *P. perniciosus*, de 4 a 8 días de edad. Las disecciones se realizaron en una solución de Tris 20 mM y NaCl 150 mM y se almacenaron a -70°C en lotes de 20 µl de dicha solución que contenían 20 glándulas. Se trabajó con un extracto crudo de proteínas salivales, obtenido tras someter las glándulas salivales a tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación en agua caliente. El extracto proteico fue utilizado en el momento o se almacenó a -70°C.

Se siguió el protocolo descrito por Rohoušová y col. (2005a). Las placas (Covalink, Nunc®) fueron tapizadas con el extracto salival a 4°C durante toda la noche a razón de 1/5 de glándula por pocillo o con las proteínas recombinantes de la saliva, en 100 µl de solución carbonato/bicarbonato 0.02 M, pH 9.5, por pocillo. Tras 2 lavados de 100 µl con PBS-Tween al 0.05%, se bloquearon las placas con leche desnatada (Bio Rad®) al 6% en PBS-Tween al 0.05% durante 1 h a 37°C. Tras 3 lavados, se incubaron durante 90 min a 37°C con los sueros diluidos en una solución que contenía leche desnatada al 2% y PBS-Tween al 0.05%. Concretamente los sueros de ratón y perro se prepararon a una dilución 1:200 y 1:50 respectivamente. Tras 4 lavados, se incubaron las placas durante 1 h a

37°C con los correspondientes anticuerpos conjugados con peroxidasa diluidos en PBS-Tween al 0'05% (anti IgG de ratón IgG AbD Serotec®, dilución 1:1.000, anti IgG de perro IgG Bethyl Laboratories®, dilución 1:3.000). Se realizaron 6 lavados para retirar el exceso de conjugado y se reveló con OPD, en solución citrato/fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0'11 M y ácido cítrico 0'5 M, pH 5'5). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 492 nm.

### **3.2.9.3 Evaluación de las proteínas recombinantes mediante *Western blot***

Tras la separación electroforética de las proteínas recombinantes por SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, mediante el sistema de transferencia seco iBLOT (Invitrogen®). La membrana se cortó en 4 tiras por cada pocillo, que se bloquearon en Tris 20 mM, NaCl 150 mM y 5% de leche desnatada (Bio-Rad®) durante toda la noche. Tras retirar el exceso de solución bloqueante, mediante 3 lavados de 5 min con Tris 20 mM, NaCl 150 mM, 0'05% de Tween-20, las membranas se incubaron con sueros de ratón, diluidos a 1:100 en Tris-Tween o sueros de perro preparados a una dilución 1:50, durante 1 h a temperatura ambiente. Tras realizar otra serie de lavados, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa, diluidos en Tris-Tween (anti IgG de ratón AbD Serotec® diluido 1:1.000, anti IgG de perro Bethyl Laboratories® diluido 1:1.000). Finalmente, las proteínas inmunogénicas fueron visualizadas mediante DAB y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### **3.2.10 Optimización de la técnica de ELISA *in house* para la determinación de anticuerpos antisaliva de *P. perniciosus* en sueros de animales**

Para la optimización de la técnica de ELISA *in house* en la UEM (ISCIII) para la detección de anticuerpos antisaliva, la técnica de ELISA inicialmente descrita por Rohoušová y col. (2005a), se sometió a diversas variaciones, detalladas en la Tabla 19. En todas las placas se incluyeron controles positivos y negativos para poder transformar las lecturas de densidad óptica en índices y así poder establecer una comparación fiable entre placas, mediante la normalización de resultados de acuerdo con la fórmula:

$$I = \frac{DO}{C^- + C^+ / A}$$

**I**, índice; **DO**, promedio de las densidades ópticas de los duplicados; **C-**, promedio de los valores de densidad óptica del lote de sueros negativos; **C+**, promedio de los valores de densidad óptica del lote de sueros positivos; **A**, punto de corte establecido inicialmente como el promedio de los valores de los sueros negativos de ratones (n=6), perros (n=6), conejos (n=11) y liebres (n=18), más dos desviaciones estándar.

Se trabajó con valores de absorbancias a los que previamente se les había restado el valor del blanco (pocillo tapizado con antígeno en ausencia de suero).

Se realizó una comparación de los resultados obtenidos en LBV (CUNI) y la UEM (ISCIII), testando la misma batería de sueros de 27 liebres y 13 conejos pertenecientes a la zona del brote de leishmaniosis humana del suroeste de la CM, además de los sueros de 17 liebres control, procedentes de República Checa.

**Tabla 19. Condiciones del ELISA *in house* para la detección de anticuerpos antisaliva establecidas en la UEM (ISCIII).**

Protocolo de ELISA <i>in house</i>	
<b>Tapizado</b>	Incubación durante toda la noche a 4°C de 1/2 glándula salival por pocillo en 100 µl de solución carbonato/bicarbonato al 0'02 M, pH 9'5.
<b>Lavados</b>	2 lavados de 100 µl con PBS-Tween al 0'05%.
<b>Bloqueo</b>	Leche desnatada (BioRad®) al 6% en PBS-Tween al 0'05%, durante 1 h a 37°C
<b>Lavados</b>	3 lavados de 100 µl con PBS-Tween al 0'05%.
<b>Sueros</b>	Incubación con sueros, diluidos a 1/50 en leche al 2%, en PBS-Tween al 0'05%, durante 3 h a 37°C.
<b>Lavados</b>	4 lavados con 100 µl de PBS-Tween al 0'05%.
<b>Conjugado</b>	Incubación con el correspondiente anticuerpo, conjugado con peroxidasa diluido en 100 µl de PBS-Tween al 0'05% (anti IgG de perro Bethyl Laboratories®, dilución 1:1.000, anti IgG de conejo AbD Serotec®, dilución 1:2.500) durante 1 h a 37°C.
<b>Lavados</b>	6 lavados con 100 µl de PBS-Tween al 0'05%.
<b>Revelado</b>	5-10 min de incubación a temperatura ambiente con 100 µl de OPD (0'5 mg/ml) en solución citrato/fosfato, pH 5'5 y 0'001% (v/v) de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , al 30%.
<b>Parada</b>	100 µl de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10%.
<b>Lectura</b>	Las lecturas de absorbancia se realizaron a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan FC (Thermo Scientific®).

### **3.2.11 Estudio de los niveles de anticuerpos IgG antisaliva de *P. perniciosus* en el suero de potenciales reservorios en el contexto del brote de leishmaniosis humana de la Comunidad de Madrid.**

Una vez estandarizadas las condiciones de ELISA *in house*, se estudió la exposición mediante la medida de los niveles de anticuerpos IgG antisaliva de *P. perniciosus* presentes en el suero de diferentes reservorios: el perro, como el reservorio doméstico clásico en la cuenca mediterránea; la liebre y el conejo como reservorios silvestres recientemente descritos.

Los sueros de **perros** con dueño, residentes en Fuenlabrada y Leganés, se obtuvieron durante la campaña antirrábica 2012 (mayo-julio) llevada a cabo por los correspondientes ayuntamientos. Dichos sueros fueron cedidos por el Dr. Javier Nieto (Unidad de Leishmaniosis y Enfermedad de Chagas, ISCIII). De los 561 sueros de perros disponibles, se eligieron 37, de acuerdo a sus características clínico-epidemiológicas reflejadas en las fichas anotadas por los veterinarios que participaron en la campaña

antirrábica. Los grupos se establecieron en función del potencial de exposición de dichos perros a la picadura de los flebotomos. Los criterios de inclusión en cada grupo, así como el número total de sueros, se especifican en la Tabla 20.

**Tabla 20. Clasificación de los perros seleccionados para el estudio de acuerdo a su potencial exposición a la picadura de los flebotomos.**

Nivel de exposición de los perros a los flebotomos	Nº de perros estudiados	Criterios de inclusión
Bajo	17	Edad < 2 años; clínicamente asintomáticos; uso de insecticidas tópicos; pernocta intradomiciliaria; serología a <i>Leishmania</i> negativa (inmunocromatografía rK39 e IFI); ausencia de viajes a zonas endémicas; ausencia de relación con casos de leishmaniosis humana o canina.
Elevado	17	Clínicamente asintomáticos; ausencia de uso de insecticidas tópicos y/o pernocta extradomiciliaria; serología a <i>Leishmania</i> negativa (inmunocromatografía rK39 e IFI).

Se utilizaron sueros de 59 **liebres** (*Lepus granatensis*) y 13 **conejos** (*O. cuniculus*) capturados durante el otoño-invierno de 2011/2012 en el parque cercano al brote de leishmaniosis humana del suroeste de Madrid. Se usaron además otros 8 conejos capturados en el invierno de 2013. Dichos animales fueron capturados por la CM en el marco de un programa de eliminación de posibles reservorios de *Leishmania* spp. en esta zona.

Como muestras de animales no expuestos a los flebotomos se emplearon 18 sueros de liebres (*Lepus europaeus*) procedentes de la República Checa, donde hasta la fecha no se ha reportado la presencia de flebotomos. Como control positivo de la exposición a los flebotomos se utilizó el suero de un conejo experimentalmente expuesto a la picadura de *P. perniciosus* de Murcia (Apartado 3.1.1). Ambos sueros control fueron suministrados por el LBV (CUNI).

### **3.2.12 Estudio de las reacciones cruzadas entre anticuerpos salivales presentes en el suero de cricetos y ratones inmunizados experimentalmente con saliva de diferentes especies de flebotomos**

Se analizó la posible reacción cruzada entre anticuerpos antisaliva presentes en los sueros de **cricetos** inmunizados frente a saliva de *P. perniciosus* y *P. argentipes*, mediante ELISA y WB. Para ello, el extracto salival de *P. perniciosus* se incubó con el lote de sueros de cricetos inmunizados frente a la saliva de *P. argentipes*. A la inversa, el extracto salival de *P. argentipes* se enfrentó a los sueros de cricetos inmunizados frente a la saliva de *P. perniciosus* (Apartado 3.2.6.1). Los cricetos inmunizados frente a la saliva de *P. argentipes* habían sido expuestos 8 veces a aproximadamente 150 picaduras cada 5-6 semanas y procedían del mantenimiento rutinario de dicha colonia en la UEM (ISCIII).

Además, se estudió mediante ELISA, (Apartado 3.2.9.2), la reacción cruzada entre anticuerpos antisaliva presentes en los sueros de **ratones** inmunizados experimentalmente con la saliva de *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *L. longipalpis* cedidos por el LBV (CUNI). Simultáneamente, se estudiaron las posibles reacciones cruzadas entre los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados a través de las picaduras de *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *L. longipalpis* frente a las proteínas recombinantes de la saliva de *P. perniciosus* rSP01B, rSP04 y rSP08.

### **3.2.13 Estadística**

Los análisis estadísticos, así como la generación de gráficas, se realizaron con el programa Prism versión 5 (GraphPad Software®).

Se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney U como herramienta para comprobar la heterogeneidad de dos grupos de muestras.

La asociación entre dos variables continuas se estableció mediante la correlación de Spearman. El coeficiente de correlación “r” oscila entre -1 y +1, e indica asociaciones negativas o positivas, respectivamente.

Se ha trabajado con niveles de significancia del 0’05, 0’01 y 0’001, expresados mediante los asteriscos (\*, \*\* y \*\*\*, respectivamente). Cuando un contraste de hipótesis proporcionó un valor “p” inferior al grado de significancia establecido en 0’05, la hipótesis nula pudo ser rechazada. Esto permitió establecer que la comparación era estadísticamente significativa.



*Resultados*

---





## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterización de la saliva de *P. perniciosus*.

#### 4.1.1 Estudio comparativo del perfil proteico de la saliva de tres colonias de *P. perniciosus* y una colonia de *P. argentipes*.

La separación de las proteínas salivales, mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y su posterior tinción con plata, dio lugar a un patrón reproducible de al menos 10 bandas en ambas especies. La mayoría de las proteínas salivales de ambas especies están comprendidas dentro de un rango de peso molecular de 25 a 45 kDa y en ambas especies existen proteínas de alrededor de 15 kDa. Sin embargo, existen notables diferencias entre los perfiles de las proteínas salivales de *P. perniciosus* y de *P. argentipes*. Por otro lado, las tres colonias de *P. perniciosus* mostraron un perfil de proteínas salivales semejante. En la Figura 30 se muestran los resultados del estudio comparativo del perfil proteico de la saliva de las dos especies estudiadas.

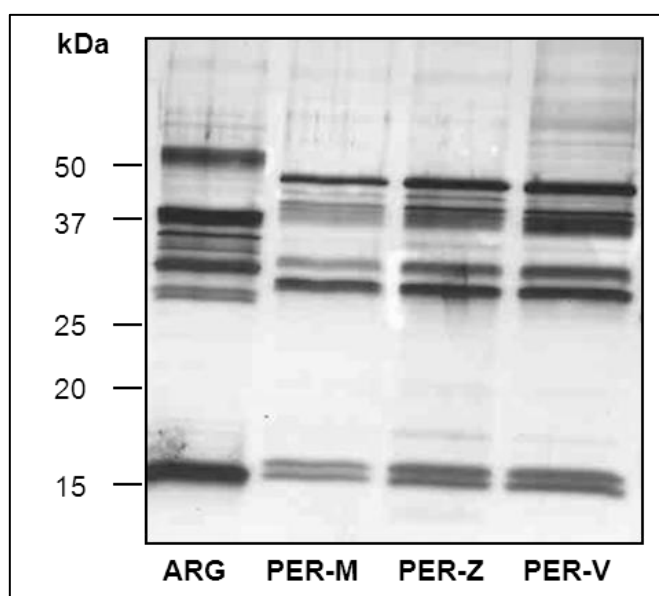


Figura 30. Gel de poliácridamida del extracto proteico de las glándulas salivales de las cuatro colonias estudiadas. ARG: *P. argentipes*. PER-M: *P. perniciosus* de Boadilla del Monte, Madrid. PER-Z: *P. perniciosus* de Zaragoza. PER-V: *P. perniciosus* de Valencia.

#### 4.1.2 Estudio del perfil proteico de la saliva en relación con la edad de los flebotomos.

Los resultados obtenidos demostraron que el contenido proteico de las glándulas salivales de *P. perniciosus* varía cuantitativa y cualitativamente en función de la edad. Se aprecia un incremento gradual del contenido proteico directamente proporcional a la edad de los flebotomos. Así, en los adultos recién emergidos únicamente son distinguibles las bandas de 27 kDa y 44 kDa. Sin embargo, a partir del tercer día aparecen las proteínas de aproximadamente 33 kDa y 37 kDa y, a partir del cuarto día, se visualizan las proteínas de 20 kDa, alcanzándose el perfil proteico definitivo (Figura 31).

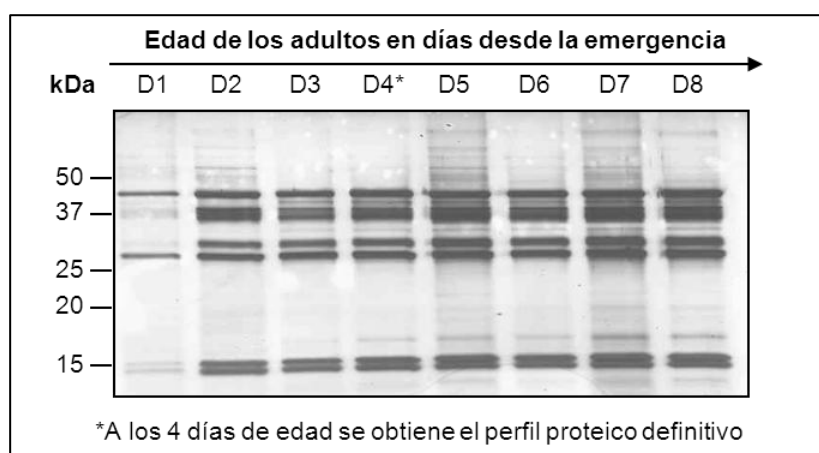
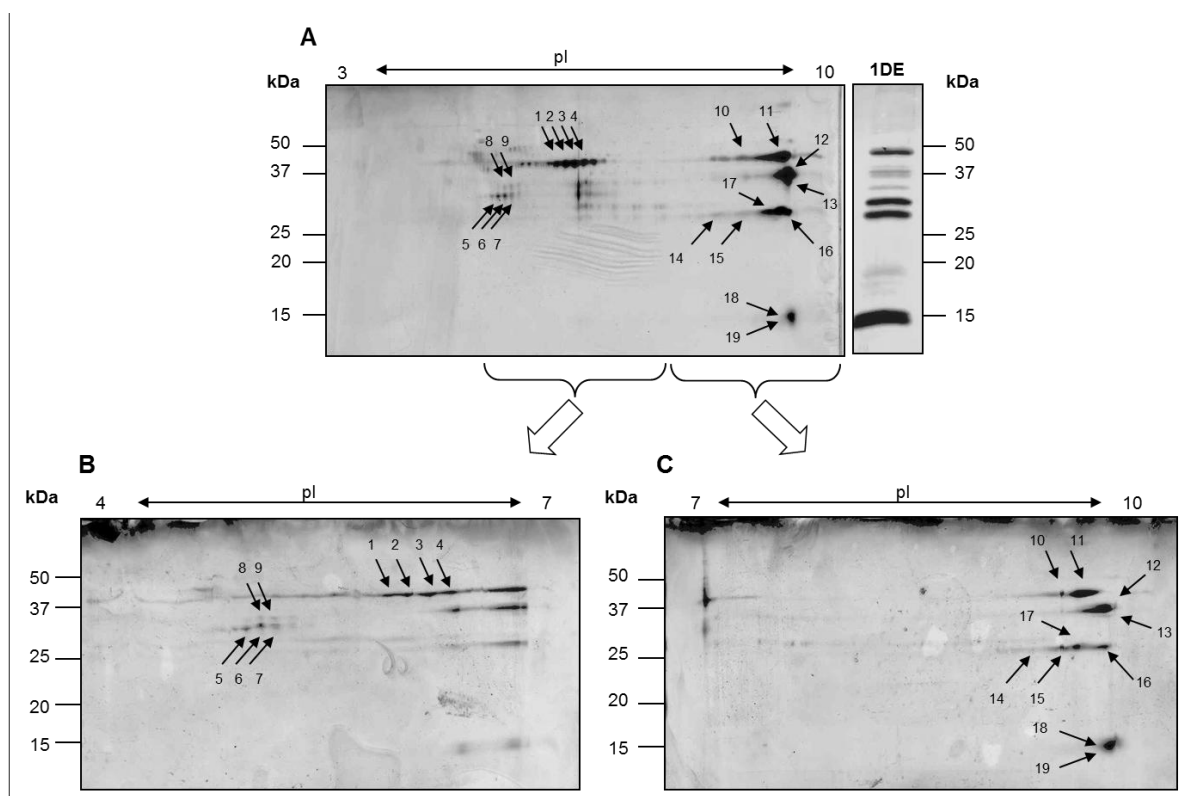


Figura 31. Comparación del patrón proteico del extracto de las glándulas salivales de *P. perniciosus* en función de la edad. D1-D8: Patrón proteico los días 1 a 8 de la emergencia de los adultos.

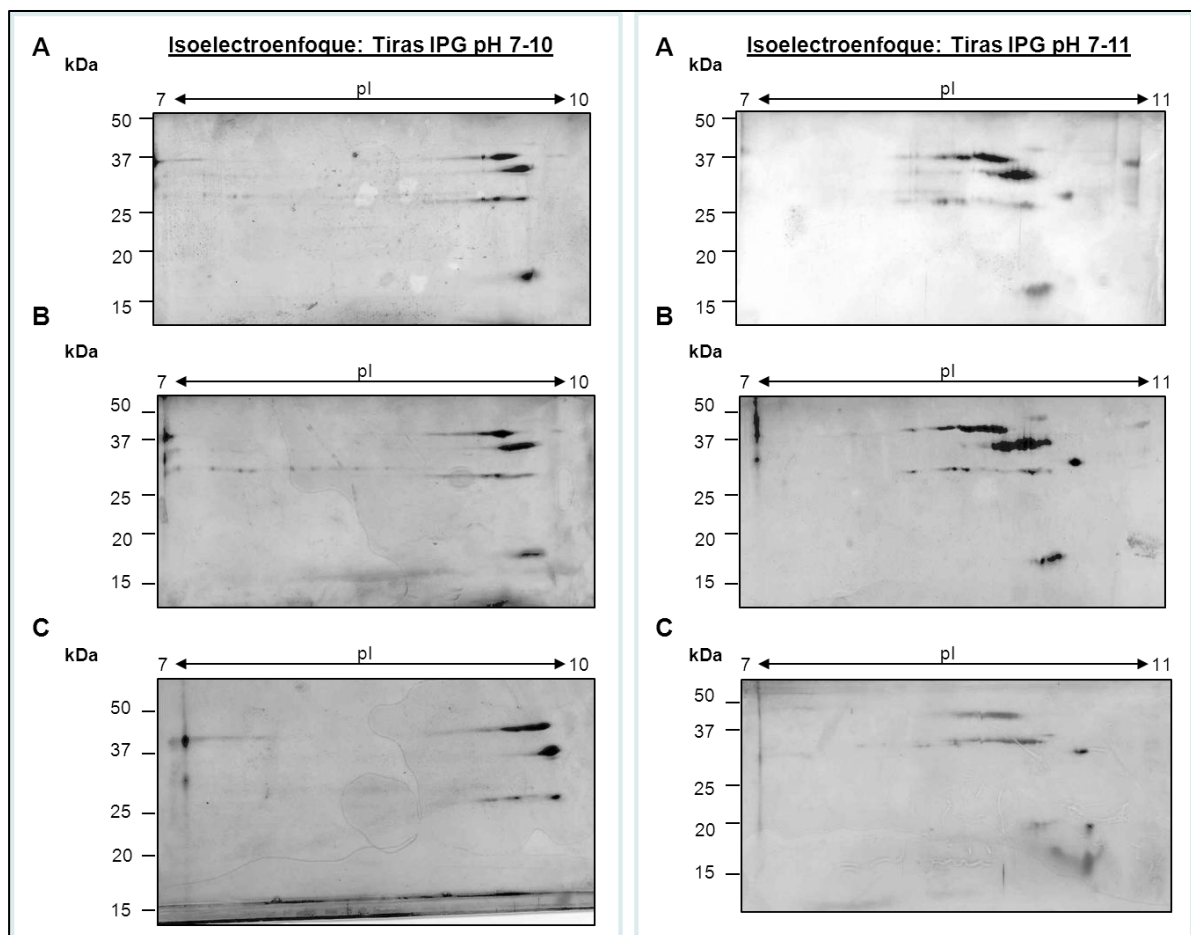
#### 4.1.3 Identificación de proteínas de la saliva de *P. perniciosus* mediante electroforesis bidimensional

Como resultado de la cuantificación proteica del extracto salival se obtuvo una concentración de 125 ng de proteína por glándula. Se llevaron a cabo diferentes procedimientos para la preparación de extractos proteicos a partir de glándulas salivales, isoelectroenfoque y electroforesis bidimensional, hasta la optimización de la metodología. Se realizaron electroforesis mono y bidimensionales en paralelo, lo que confirmó la correspondencia del patrón obtenido por ambas metodologías (Figura 32). Inicialmente las proteínas de la saliva se separaron utilizando tiras IPG de pH 3 a 10, lo que permitió obtener una representación global de su distribución. La mayoría de las proteínas se agrupan en el rango de pH de 4 a 6 y alrededor de pH 9. Por lo tanto, se utilizaron tiras IPG de menor rango de pH (4 a 7 y 7 a 10) para mejorar la resolución de las zonas donde se concentraban la mayoría de los *spots* (Figura 32).



**Figura 32. Electroforesis bidimensional de los extractos proteicos de 60 glándulas salivales de *P. perniciosus*. A) Tiras IPG de pH 3 a 10. B) Tiras IPG de pH 4 a 7. C) Tiras IPG de pH 7 a 10. Los números en los geles se corresponden con las proteínas identificadas, descritas en la Tabla 21.**

También se optimizó la separación de las proteínas básicas de la saliva de *P. perniciosus* de una forma más eficaz. Para ello se emplearon tiras IPG de rango de pH de 7 a 10 y 7 a 11 en el isoelectroenfoque, ya que el pI de la mayoría de las proteínas salivales descritas para esta especie se encuadran en este rango de pH. Además, se realizaron pruebas con menor cantidad de proteína para aumentar el poder de resolución (Figura 33).



**Figura 33. Electroforesis bidimensional de los extractos proteicos preparados a partir de diferente número de glándulas salivales de *P. perniciosus*, utilizando tiras IPG de pH 7 a 10 y 7 a 11. A) 60 glándulas. B) 30 glándulas. C) 15 glándulas.**

En total se cortaron 19 *spots* que fueron analizados por MALDI-TOF o MALDI-TOF/TOF, permitiendo identificar 10 proteínas salivales, recogidas en la Tabla 21. Entre ellas se encuentran 2 proteínas amarillas (SP03 y SP03B), 2 apirinas (SP01 y SP01B), 3 proteínas relacionadas con D7 (SP16 de *P. ariasi*, SP04 y SP04B), 2 proteínas similares a la PpSP15 (SP02 y SP13 de *P. argentipes*) y una proteína relacionada con ParSP25 (SP08).

La ionización por MALDI, acoplada a un analizador TOF, permitió determinar con gran exactitud la masa de los péptidos resultantes de la digestión con tripsina de las proteínas cortadas de los geles. La medida de la masa de dichos fragmentos proteicos generó un espectro característico de cada proteína (huella peptídica de masa). En 6 de los *spots*, la identificación de las proteínas se llevó a cabo por comparación de la huella peptídica de masa experimental con las masas teóricas por la digestión *in silico* de todas las secuencias incluidas en las bases de datos de proteínas, indicado como MALDI-TOF

en la Tabla 21. En el caso de los restantes *spots* (n=13) la identificación no pudo completarse únicamente a través de la huella peptídica de masa por lo que, tras la ionización MALDI, se acopló a un analizador TOF/TOF que permitió determinar las masas de los fragmentos derivadas de la descomposición metaestable de péptidos. Dicha descomposición generó la denominada huella peptídica de fragmentación del péptido, la cual es característica de la secuencia del mismo y permite su identificación inequívocamente (Tabla 21).

En la mayoría de los casos se obtuvo una buena concordancia entre los valores experimentales y teóricos de masa y pI, sin embargo, se observaron algunas discordancias destacables, fundamentalmente en el pI, como queda reflejado en la Tabla 21. La numeración de los *spots* en los geles de la Figura 32 se corresponde con la señalada en la Tabla 21.

Tabla 21. Proteínas de las glándulas salivales de *P. perniciosus* identificadas mediante MALDI-TOF/TOF.

Nº de spot	Nº acceso NCBI	Familia proteínas	Técnica	Masa (kDa) Exp/Teo		pI (Exp/Teo)		Péptidos concordantes	Péptidos secuenciados	Concordancia %	Índice MASCOT*
1	ABA43049 SP03 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Proteína amarilla	MALDI TOF/TOF	44'000	43'965	6'20	5'91	10	K.KIFITIPR.L R.ISCWNTQK.S R.QAYYLGGSTK.L R.GSHSEALALAYDPK.T K.LISVYQPVIDECR.R K.LISVYQPVIDECRR.L K.LGIFGITLGDLDEEGNR.Q R.RLWIVDAGQVEYKGDEQK.I K.FPGSDKLISVYQPVIDECR.R K.ISHDSFKPEHESILTHNGAQHILK.L	30	329
2	ABA43049 SP03 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Proteína amarilla	MALDI TOF/TOF	44'000	43'965	6'38	5'91	19	K.KIFITIPR.L K.KIFITIPR.L R.ISCWNTQK.S R.QAYYLGGSTK.L K.RISCWNTQK.S K.VIFFIEYNSK.R K.VIFFIEYNSK.R.I R.GSHSEALALAYDPK.T R.RLWIVDAGQVEYK.G K.LISVYQPVIDECR.R R.LNPVPITLTDLDTTK.H K.LISVYQPVIDECRR.L K.LGIFGITLGDLDEEGNR.Q R.LWIVDAGQVEYKGDEQK.I R.RLWIVDAGQVEYKGDEQK.I K.FPGSDKLISVYQPVIDECR.R R.LWIVDAGQVEYKGDEQKIPK.K R.LNPVPITLTDLDTTKHPEGSPPLSK.F K.ISHDSFKPEHESILTHNGAQHILK.L	40	659

Tabla 21: Continuación.

Nº de spot	Nº acceso NCBI	Familia proteínas	Técnica	Masa (kDa) Exp/Teo		pI (Exp/Teo)		Péptidos concordantes	Péptidos secuenciados	Concordancia %	Índice MASCOT*
3	ABA43049 SP03 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Proteína amarilla	MALDI TOF/TOF	44'000	43'965	6'50	5'91	13	K.IFITIPR.L K.KIFITIPR.L R.QAYYLGGSTK.L K.VIFFIEYNSK.R R.GSHSEALALAYDPK.T K.LISVYQPVIDECR.R K.LISVYQPVIDECRR.L K.LGIFGITLGDLDEEGNR.Q R.RLWIVDAGQVEYKGDEQK.I K.FPGSDKLISVYQPVIDECR.R R.LWIVDAGQVEYKGDEQKIPK.K R.LNPVPITLTELDTTKHPEGSPPLSK.F K.ISHDSFKPEHESILTHNGAQHILK.L	38	337
4	ABA43049 SP03 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Proteína amarilla	MALDI TOF/TOF	44'000	43'965	6'62	5'91	22	K.IFITIPR.L K.KIFITIPR.L R.ISCWNTQK.S R.QAYYLGGSTK.L K.RISCWNTQK.S K.VIFFIEYNSK.R K.VIFFIEYNSKR.I R.GSHSEALALAYDPK.T R.RLWIVDAGQVEYK.G K.LISVYQPVIDECR.R R.LNPVPITLTELDTTK.H K.LISVYQPVIDECRR.L K.LGIFGITLGDLDEEGNR.Q R.LWIVDAGQVEYKGDEQK.I R.RLWIVDAGQVEYKGDEQK.I K.FPGSDKLISVYQPVIDECR.R R.LWIVDAGQVEYKGDEQKIPK.K K.FPGSDKLISVYQPVIDECRR.L R.RLWIVDAGQVEYKGDEQKIPK.K K.TFVYITNFEDNTLIVYDQEKK.D R.LNPVPITLTELDTTKHPEGSPPLSK.F K.ISHDSFKPEHESILTHNGAQHILK.L	46	519



Tabla 21: Continuación.

Nº de spot	Nº acceso NCBI	Familia proteínas	Técnica	Masa (kDa) Exp/Teo		pI (Exp/Teo)		Péptidos concordantes	Péptidos secuenciados	Concordancia %	Índice MASCOT*
5	ABA43056 SP08 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Similar a Par25kDa	MALDI TOF	35'000	29'701	5'33	4'93	7	R.DPGFYRR.G R.IRPCLESVTK.Y K.YFNMLNDDLAR.E R.YYAVHAKDFER.I R.ANGDYGYSYENR.H R.GGGGAGDSSRDPGFYR.R R.HHVNGDEEEHEIKHTNSR.K	31	136
6	ABA43056 SP08 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Similar a Par25kDa	MALDI TOF/TOF	35'000	29'701	5'45	4'93	7	R.DPGFYRR.G R.IRPCLESVTK.Y K.YFNMLNDDLAR.E R.YYAVHAKDFER.I R.ANGDYGYSYENR.H R.GGGGAGDSSRDPGFYR.R R.HHVNGDEEEHEIKHTNSR.K	31	188
7	ABA43056 SP08 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Similar a Par25kDa	MALDI TOF/TOF	35'000	29'701	5'56	4'93	10	R.DPGFYRR.G R.IRPCLESVTK.Y K.YFNMLNDDLAR.E R.ANGDYGYSYENR.H R.GGGGAGDSSRDPGFYR.R R.HHVNGDEEEHEIKHTNSR.K R.YYAVHAK.D R.QCYLDR.L	40	238
8	ABA43056 SP08 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Similar a Par25kDa	MALDI TOF	37'000	29'701	5'45	4'93	6	R.DPGFYRR.G R.IRPCLESVTK.Y K.YFNMLNDDLAR.E R.YYAVHAKDFER.I R.ANGDYGYSYENR.H R.GGGGAGDSSRDPGFYR.R R.HHVNGDEEEHEIKHTNSR.K R.LNSYTTAISQYTVTTNACINNR.L	30	117
9	ABA43056 SP08 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Similar a Par25kDa	MALDI TOF	37'000	29'701	5'56	4'93	7	R.DPGFYRR.G R.IRPCLESVTK.Y K.YFNMLNDDLAR.E R.YYAVHAKDFER.I R.ANGDYGYSYENR.H R.GGGGAGDSSRDPGFYR.R R.HHVNGDEEEHEIKHTNSR.K	31	129

Tabla 21: Continuación.

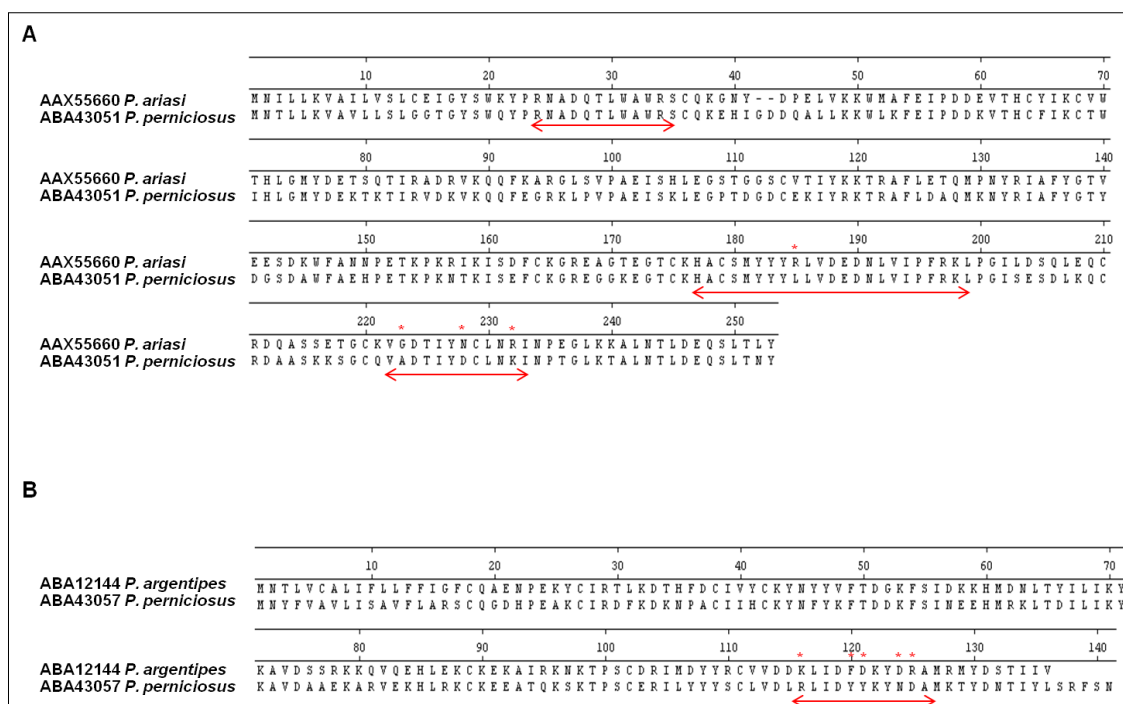
Nº de spot	Nº acceso NCBI	Familia proteínas	Técnica	Masa (kDa) Exp/Teo		pI (Exp/Teo)		Péptidos concordantes	Péptidos secuenciados	Concordancia %	Índice MASCOT*
10	ABA43050 SP03B [ <i>P. perniciosus</i> ]	Proteína amarilla	MALDI TOF	44'000	44'872	9'59	8'81	6	K.FDPVNLGNR.G R.VGLFGITLGDR.D K.VIFFAESDSR.Q K.LINVYQPVIDECR.R R.DPEGNRPAYYIAGSSTK.L K.IAGSNTIPFGGFAVDVTNPK.E	20	110
11	ABA43050 SP03B [ <i>P. perniciosus</i> ]	Proteína amarilla	MALDI TOF/TOF	44'000	44'872	9'55	8'81	12	R.LWIADVGR.V K.FDPVNLGNR.G R.RLWIADVGR.V R.VGLFGITLGDR.D K.VIFFAESDSR.Q R.GPHTEAVALVYDPK.T K.LINVYQPVIDECR.R R.QVSCWNTQKPLNHK.N R.DPEGNRPAYYIAGSSTK.L R.RSPQIPFTLTLDTTK.H K.IAGSNTIPFGGFAVDVTNPK.E K.ISHGSFKPEHDSTLSHDGK.Q	38	322
12	ABB00906 SP01 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Apirasa	MALDI TOF	36'000	37'901	9'59	9'14	11	K.NNDIFALK.T K.NLWVFMPR.K R.SENLHYFTK.D K.CTNEPYTVR.L R.KCTNEPYTVR.L K.IAAYGTVIDINGK.T K.TMNIDRDALWVK.E K.IEGDIKDPASGFSSFK.F K.LYTLNDETGTIYEVK.H K.TGCNQIITANEDFSEIK.T K.TIKIEGDIKDPASGFSSFK.F	33	132
13	ABB00907 SP01B [ <i>P. perniciosus</i> ]	Apirasa	MALDI TOF/TOF	34'000	37'641	9'88	8'82	8	K.SENLHYFTR.Y R.FIPFALIADLDR.K R.GAELSELLYFNDK.L R.ILDDKYEGIAFFK.D R.ILDDKYEGIAFFKDPK.G K.VIDHNGEVTINWENQYK.K K.DAMGMSSGFVWHEAVNWSPR.K K.VIDHNGEVTINWENQYKK.V	26	202

Tabla 21: Continuación.

Nº de spot	Nº acceso NCBI	Familia proteínas	Técnica	Masa (kDa) Exp/Teo		pI (Exp/Teo)		Péptidos concordantes	Péptidos secuenciados	Concordancia %	Índice MASCOT*
14	AAX55660 SP16 [ <i>P. ariasi</i> ]	Relacionada con D7	MALDI TOF	29'000	29'410	8'95	7'46	5	K.HACSMYYYYR.L R.NADQTLWAWR.S K.VGDTIYNCLNR.I R.LVDEDNLVIPFR.K R.LVDEDNLVIPFRK.L	17	97
15	AAX55660 SP16 [ <i>P. ariasi</i> ]	Relacionada con D7	MALDI TOF/TOF	29'000	29'410	9'20	7'46	4	K.HACSMYYYYR.L R.NADQTLWAWR.S R.LVDEDNLVIPFR.K R.LVDEDNLVIPFRK.L	12	229
16	ABA43051 SP04 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Relacionada con D7	MALDI TOF/TOF	29'000	29'485	9'50	8'41	5	K.VKQQFEGR.K K.SGCQVADTIYDCLNK.I K.FEIPDDKVTHCFIK.C K.WLKFEIPDDKVTHCFIK.C	24	156
17	ABA43051 SP04B [ <i>P. perniciosus</i> ]	Relacionada con D7	MALDI TOF/TOF	29'000	29'575	8'34	8'81	13	R.IAFYGTYDGSDAWFAEHPETKPK.N R.GVQIPPELEK.I R.KLPGISESDLK.E R.NADQTLWAFR.S K.WMNPWELPNDR.E R.LVDEDNLVIPFR.K K.LPGISESDLKECR.D R.LVDEDNLVIPFRK.L K.IGGPTSGSCKDVYDK.T K.CVWIHLGSYNHNK.H R.KLPGISESDLKECR.D K.VADEIYECLHNVR.K K.TNLQKAYYGTKEKSNK.W K.EDSNKWYSENPDTKPK.G K.NYHFIDNKFR.I	49	337
18	ABA43048 SP02 [ <i>P. perniciosus</i> ]	Similar a PpSP15	MALDI TOF/TOF	17'000	17'425	9'50	9'18	1	K.NYHFIDNKFR.I	7	93
19	ABA12144 SP13 [ <i>P. argentipes</i> ]	Similar a PpSP15	MALDI TOF/TOF	17'000	16'788	9'50	8'70	1	K.LIDFDKYDR.A	6	86

\* Valores del índice de MASCOT superiores a 50 indican identidad significativa o elevada homología.

Se identificaron una proteína de *P. ariasi* y otra de *P. argentes* en la saliva de *P. perniciosus* (Tabla 21, Figura 32). Se realizaron alineamientos de las secuencias aminoácidas de estas proteínas con sus correspondientes homólogos en *P. perniciosus*, y observamos un porcentaje elevado de similitud entre ellas (Figura 34).



**Figura 34.** Alineamientos de las proteínas SP16 de *P. ariasi* (GenBank: AAX55660) y SP13 de *P. argentes* (GenBank: ABA12144) con sus homólogos respectivos en *P. perniciosus* (SP04, GenBank: ABA43051 y SP09, GenBank: ABA43057, respectivamente). A) Alineamiento de AAX55660 con ABA43051. B) Alineamiento de ABA12144 con ABA43057. Las zonas subrayadas indican los aminoácidos identificados por espectrometría de masas. Los asteriscos indican los aminoácidos no coincidentes en los péptidos secuenciados.

Por otro lado, se estudiaron los sitios potenciales de fosforilación y glicosilación de las proteínas de la saliva de *P. perniciosus* mediante programas informáticos predictivos (Apartado 3.2.7.14) que pudieran aportar datos de las diferencias de movilidad. Los resultados de este análisis quedan reflejados en la Tabla 22.

**Tabla 22. Predicción *in silico* de los sitios de glicosilación y de fosforilación en las proteínas salivales de *P. perniciosus* identificadas.**

Proteína (Nº acceso NCBI)	Predicción de sitios de glicosilación			Predicción de sitios de fosforilación		
	O-glicosilación		N-glicosilación			
	Ser	Thr	Asn-Xaa-Ser/Thr	Ser	Thr	Tyr
SP01 (ABB00906)	-	-	-	5	5	10
SP01B (ABB00907)	-	-	-	5	2	7
SP02 (ABA43048)	-	-	1	4	1	2
SP03 (ABA43049)	-	3	1	16	7	4
SP03B (ABA43050)	-	4	1	15	6	5
SP04 (ABA43051)	-	-	-	2	3	3
SP04B (ABA43052)	-	-	-	7	3	5
SP05 (ABA43053)	4	7	2	9	6	4
SP06 (ABA43054)	-	-	3	15	3	9
SP07 (ABA43055)	-	-	1	7	2	6
SP08 (ABA43056)	-	1	-	9	-	12
SP09 (ABA43057)	-	-	-	3	2	1
SP10 (ABA43058)	-	-	2	4	7	3
SP11 (ABA43059)	-	-	-	2	-	1
SP12 (ABA43060)	-	1	2	1	2	-
SP13 (ABA43061)	-	-	1	4	-	1
SP15 (ABB00905)	-	-	-	3	-	-
SP18 (ABA43062)	-	1	4	6	3	2
SP19 (ABA43063)	-	7	6	22	7	-
SP32 (ABA43064)	-	-	6	8	1	4

\*La N-glicosilación tiene lugar en residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) tras una asparragina (Asn) y otro aminoácido (Xaa).

## 4.2 Inmunización de ratones y cricetos con la saliva de *P. perniciosus* a través de la picadura

Se inmunizaron 10 y 6 ratones de acuerdo con las Pautas 1 y 2 de inmunización, respectivamente y 6 cricetos (Apartado 3.2.6.1). Los resultados obtenidos respecto a la inmunización de los ratones según la Pauta 3 se describen en el Apartado 4.4.1. En la Figura 35 se muestra en detalle el proceso de la inmunización de los ratones y los cricetos.

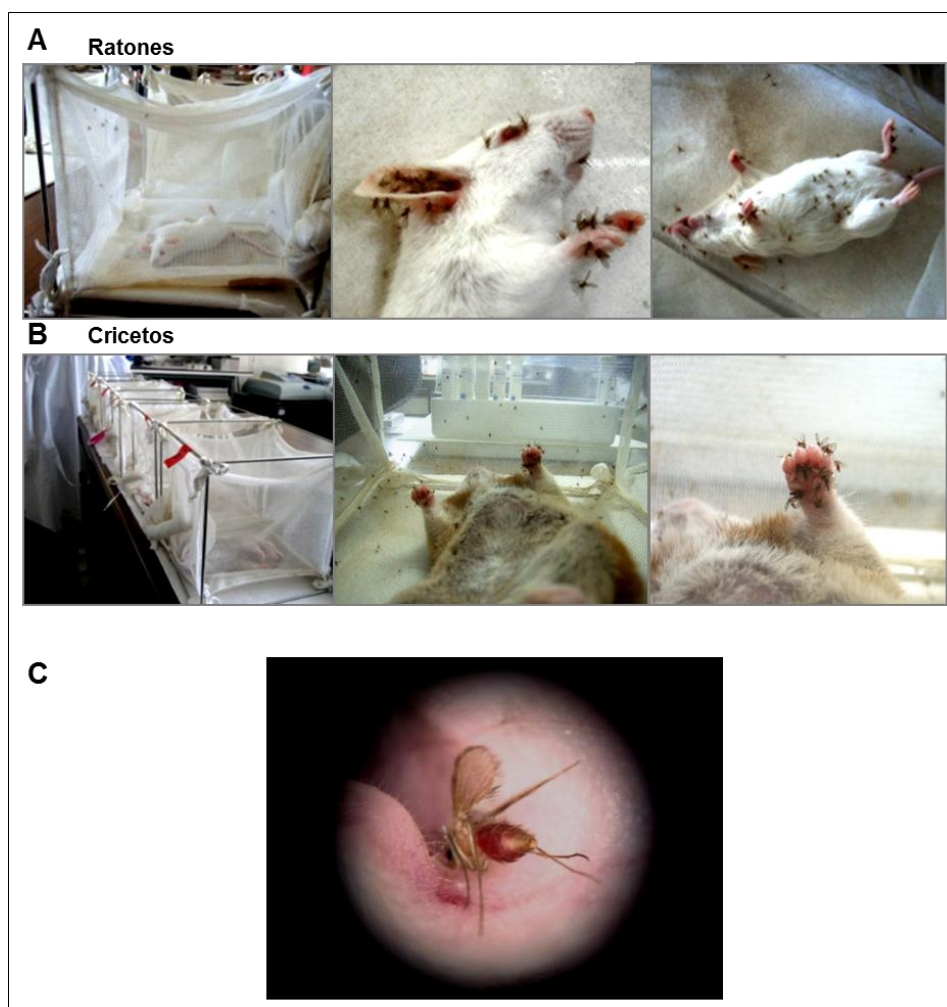


Figura 35. Inmunización de animales con la saliva de *P. perniciosus* a través de la picadura. A) Ratones BALB/c anestesiados recibiendo picaduras de *P. perniciosus*. B) Flebotomos alimentándose sobre los cricetos anestesiados. En ambos casos, las picaduras fundamentalmente se producen en las zonas del animal con menos pelo (patas y orejas). C) Detalle de un flebotomo alimentándose de la oreja de un ratón, imagen tomada a través de un microscopio estereoscópico.

El hecho de que las inmunizaciones se realizaran de forma individualizada nos permitió conocer el número de hembras alimentadas sobre cada animal, información recogida en la Tabla 23. Asimismo, se determinó el porcentaje de hembras alimentadas respecto a las hembras expuestas para cada grupo de animales, siendo la media para los ratones de un 71'91% (Pauta 1: 70'58% y Pauta 2: 73'24%) y para los cricetos de un 93'85%.

**Tabla 23. Número de flebotomos alimentados sobre ratones y cricetos en las distintas pautas de inmunización con la saliva de *P. perniciosus* a través de la picadura.**

Ratones				Cricetos	
Pauta 1		Pauta 2		Pauta 1	
Ratones	Nº flebotomos alimentados	Ratones	Nº flebotomos alimentados	Cricetos	Nº flebotomos alimentados
R1	589	R1	444	C1	888
R2	553	R2	433	C2	973
R3	645	R3	454	C3	927
R4	599	R4	248	C4	884
R5	486	R5	404	C5	860
R6	561	R6	434	C6	913
R7	654				
R8	335				
R9	703				
R10	705				
<b>Total</b>	<b>5830</b>	<b>Total</b>	<b>2417</b>	<b>Total</b>	<b>5445</b>
<b>Promedio</b>	<b>583</b>	<b>Promedio</b>	<b>403</b>	<b>Promedio</b>	<b>908</b>

Al día siguiente a la inmunización, se anotaron las hembras alimentadas que no sobrevivieron del total de hembras alimentadas sobre todos los animales, para cada pauta de inmunización (Tablas 24 y 25).

**Tabla 24. Número de picaduras acumuladas en los ratones en cada proceso de inmunización y mortalidad de los flebotomos alimentados.**

Pauta 1				Pauta 2			
Nº de inmunización	Nº picaduras acumuladas	Flebotomos muertos		Nº de inmunización	Nº picaduras acumuladas	Flebotomos muertos	
		Nº	%			Nº	%
1ª	497	12	2´41	1ª	497	101	20´32
2ª	1321	62	4´69	2ª	1110	222	20´00
3ª	2157	158	7´32	3ª	1558	83	5´33
4ª	2709	28	1´03	4ª	1903	50	2´63
5ª	3053	97	3´18	5ª	2210	10	0´45
6ª	3356	10	0´30	6ª	2417	12	0´50
7ª	3886	17	0´44				
8ª	4494	31	0´69				
9ª	5130	17	0´33				
10ª	5830	127	2´18				

**Tabla 25. Número de picaduras acumuladas en los cricetos en cada proceso de inmunización y mortalidad de los flebotomos alimentados.**

Nº de inmunización	Nº picaduras acumuladas	Flebotomos muertos	
		Nº	%
1ª	580	53	9´14
2ª	1104	82	7´43
3ª	1557	15	0´96
4ª	2087	18	0´86
5ª	2644	78	2´95
6ª	3238	45	1´39
7ª	3789	87	2´30
8ª	4326	36	0´83
9ª	4810	21	0´44
10ª	5445	18	0´33

Al analizar los resultados mediante el test de Spearman, no se observó en ninguna de las tres inmunizaciones una relación estadísticamente significativa entre el incremento de las picaduras de flebotomos y la mortalidad de flebotomos registrada al día siguiente (Tabla 26).



Tabla 26. Relación entre el número de picaduras acumuladas por cada grupo de animales y la mortalidad de los flebotomos alimentados sobre dicho grupo analizada con el test no paramétrico de Spearman.

	Ratones		Cricetos
	Pauta 1	Pauta 2	Pauta 1
r	0'043	-0'886	0'213
p	0'907	0'019	0'555

Por otro lado, los sueros obtenidos a través de todas las pautas de inmunización presentaron niveles de anticuerpos IgG frente a la saliva de *P. perniciosus* significativamente superiores a los niveles de sueros de animales no inmunizados ( $p < 0'01$ ). Los ratones inmunizados mediante la Pauta 1 desarrollaron un mayor nivel de anticuerpos (promedio de  $DO \pm$  desviación estándar:  $0'87 \pm 0'16$ ) que los ratones inmunizados mediante la Pauta 2 ( $0'36 \pm 0'06$ ) en comparación con el grupo no inmunizado ( $0'09 \pm 0'008$ ). El lote de sueros de cricetos inmunizados también presentó un nivel de anticuerpos IgG específicos frente a la saliva significativamente superior ( $0'95 \pm 0'19$ ) al del grupo control de animales no inmunizados ( $0'040 \pm 0'040$ ), valores recogidos en la Figura 36.

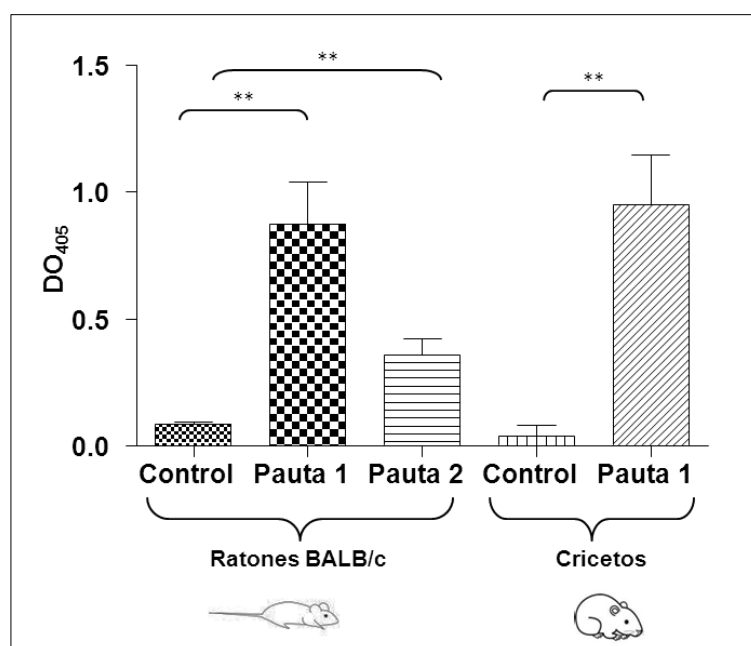
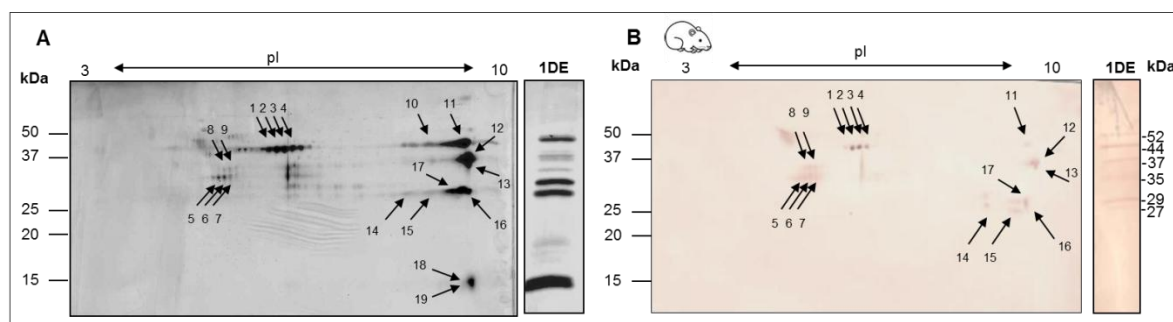


Figura 36. Niveles de anticuerpos IgG frente a la saliva de *P. perniciosus* en sueros de animales inmunizados de acuerdo a las diferentes pautas. Los resultados se expresan como la media de los valores de densidad óptica ajustada.  
(\*\*):  $p < 0'01$

### 4.3 Detección e identificación de proteínas antigénicas en la saliva de *P. perniciosus*

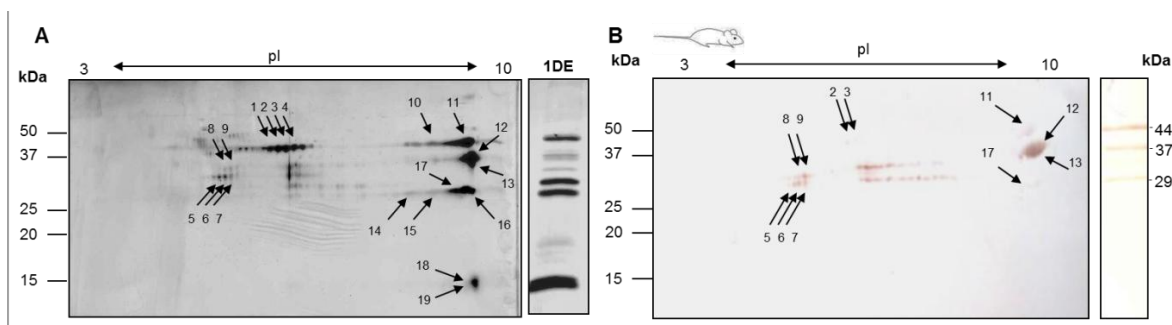
El reconocimiento de las proteínas salivales por los sueros de animales inmunizados que presentaron mayor nivel de anticuerpos se estudió mediante *WB*. El conjunto de los sueros de cricetos inmunizados (Apartado 3.2.6.1) reconoció mayoritariamente las bandas proteicas de 52, 44, 37, 35, 29 y 27 kDa en los geles monodimensionales (Figura 37). El lote de sueros de ratones inmunizados de acuerdo a la Pauta 1 reconoció únicamente las bandas de 44, 37 y 29 kDa (Figura 38).

En relación a los experimentos de electroforesis bidimensional, los *spots* reconocidos por los sueros de ratones y cricetos, fueron identificados como SP03 (*spots* 2 y 3), SP03B (*spot* 11), SP08 (*spots* 5-9), SP01 (*spot* 12), SP01B (*spot* 13) y SP04B (*spot* 17), tal y como se detalla en la Figura 37A y B. Sin embargo, se aprecian diferencias en la intensidad del reconocimiento entre los sueros de ambos animales (Figuras 37 y 38, Tabla 27).



**Figura 37. A) Electroforesis bidimensional de los extractos proteicos de las glándulas salivales de *P. perniciosus*. B) Reconocimiento mediante *WB* de las proteínas de la saliva tras electroforesis monodimensional (40 glándulas) y bidimensional (100 glándulas), utilizando sueros hiperinmunes de cricetos.**

Los sueros de los cricetos reconocieron intensamente varios *spots* identificados como la proteína amarilla SP03 (*spots* 1-4), mientras que los sueros de los ratones reaccionaron débilmente con dos *spots* de la serie SP03 (*spots* 2 y 3). Ambos sueros mostraron un intenso reconocimiento frente a la proteína SP08 (*spots* 5-9). Las apirastas (*spots* 12 y 13) fueron reconocidas principalmente por los sueros de los ratones (Figura 38). Las proteínas relacionadas con D7 (*spots* 14-16) destacaron como antígenos en el caso de los sueros de cricetos (Figura 37). Los *WB* se realizaron en paralelo con suero de animales no inmunizados (controles negativos), no observándose reconocimiento antigénico por parte de estos sueros.



**Figura 38. A) Electroforesis bidimensional de los extractos proteicos de las glándulas salivales de *P. perniciosus*. B) Reconocimiento mediante WB de las proteínas de la saliva tras electroforesis monodimensional (40 glándulas) y bidimensional (150 glándulas), utilizando sueros hiperinmunes de ratones.**

**Tabla 27. Diferencias en intensidad del reconocimiento de los antígenos salivales.**

	SP01	SP01B	SP03	SP03B	SP04	SP04B	SP08
<b>Ratones</b>	++++	++++	+	+	-	-	+++
<b>Cricetos</b>	++	++	+++	+	+	+	++

(-): Ausencia de señal.

(+, ++, +++ y ++++): Gradiente de intensidad de reconocimiento de menor a mayor.

#### 4.4 Cinética de anticuerpos IgG antisaliva en animales de experimentación

##### 4.4.1 Cinética de anticuerpos antisaliva en ratones BALB/c

Se realizó un seguimiento de la respuesta de anticuerpos IgG antisaliva en 8 ratones BALB/c inmunizados según la Pauta 3 (Apartados 3.2.6.1 y 3.2.10) durante las 12 semanas de exposición a las picaduras de *P. perniciosus*, en las 12 semanas posteriores y tras una exposición de recuerdo en la semana 24 del estudio. El recuento de las hembras alimentadas sobre cada ratón, en cada exposición, arrojó un porcentaje de alimentación del 72,84% de los flebotomos (Tabla 28).

**Tabla 28. Flebotomos alimentados sobre cada ratón, inmunizados mediante la Pauta 3.**

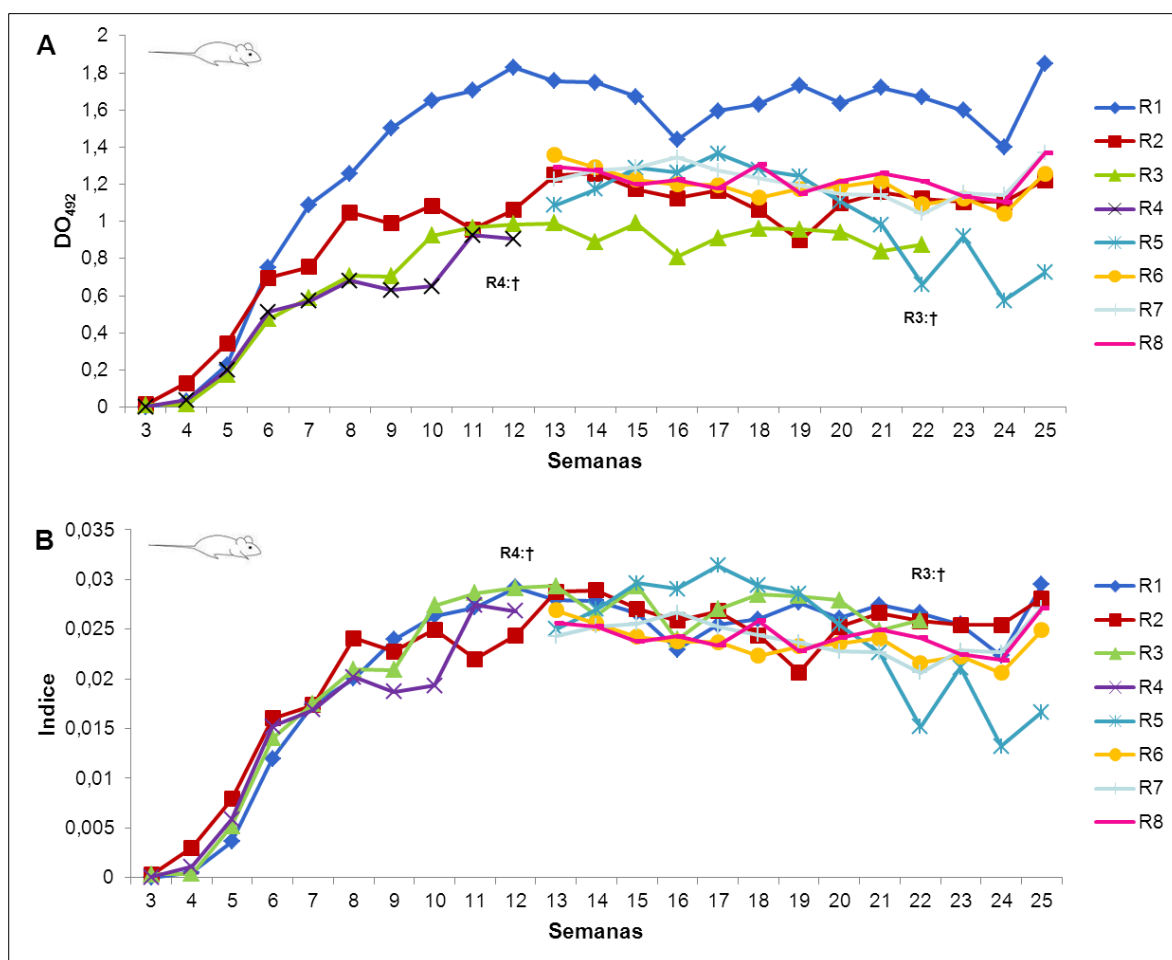
Semana	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
<b>S1</b>	85	127	98	120	10	38	44	31
<b>S2</b>	81	66	71	72	60	54	21	79
<b>S3</b>	25	70	58	62	77	53	56	41
<b>S4</b>	96	79	124	68	48	55	44	27
<b>S5</b>	74	71	73	73	70	64	43	35
<b>S6</b>	57	33	17	62	65	26	88	83
<b>S7</b>	109	116	91	110	96	99	54	102
<b>S8</b>	94	97	49	102	71	98	77	56
<b>S9</b>	143	150	91	107	98	94	88	93
<b>S10</b>	112	127	109	79	66	58	76	97
<b>S11</b>	139	127	82	117	88	74	76	150
<b>S12*</b>	130	104	92	-	83	89	124	83
<b>S24*</b>	108	116	-	-	125	118	110	77
<b>Total</b>	<b>1.253</b>	<b>1.283</b>	<b>955</b>	<b>972</b>	<b>957</b>	<b>920</b>	<b>901</b>	<b>954</b>

\*Los ratones 3 y 4 murieron durante el experimento.

A los ratones R1 a R4 se les extrajo sangre semanalmente a partir de la semana 3 del experimento, por lo que su suero nos permitió evaluar la cinética de los anticuerpos antisaliva durante la fase de inmunización. Los sueros de todos los ratones (R1 a R8) se utilizaron en el estudio de la cinética de los anticuerpos antisaliva durante la fase de seguimiento posterior a la inmunización (Figura 39).

Al analizar el nivel de anticuerpos IgG antisaliva en los sueros de los ratones se observó un incremento gradual, de acuerdo con el número de inmunizaciones recibidas, que alcanzó niveles detectables en la cuarta semana. Los niveles de anticuerpos IgG específicos siguieron aumentando hasta la semana 12, fin de las inmunizaciones. Durante las siguientes 12 semanas, los niveles de IgG se mantuvieron, o en algunos casos disminuyeron

ligeramente. La exposición de estos animales nuevamente a las picaduras de *P. perniciosus*, en la semana 24 del experimento, supuso un incremento de los niveles de IgG antisaliva. En la mayoría de los casos, alcanzaron o incluso superaron los niveles máximos obtenidos en la fase de inmunización. En la Figura 39 se muestran los resultados de la cinética de anticuerpos antisaliva expresados en  $DO_{492}$  y la conversión a índices realizada para la normalización de los resultados, según el Apartado 3.2.10



**Figura 39. Cinética de anticuerpos IgG antisaliva en ratones BALB/c. A) Niveles de anticuerpos expresados en  $DO$  o B) en índices. La extracción de sangre de los ratones R5 a R8 se inició en la semana 13.**

†: Los ratones R3 y R4 murieron en las semanas 22 y 12, respectivamente.

El nivel de anticuerpos antisaliva de tipo IgG aumenta proporcionalmente al número de picaduras de *P. perniciosus*. Existe una correlación positiva estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ), entre el nivel de anticuerpos IgG antisaliva y el número de picaduras acumuladas durante el periodo de inmunización, como se puede observar en la Figura 40. El análisis de los datos convertidos a índices dio lugar a resultados similares.

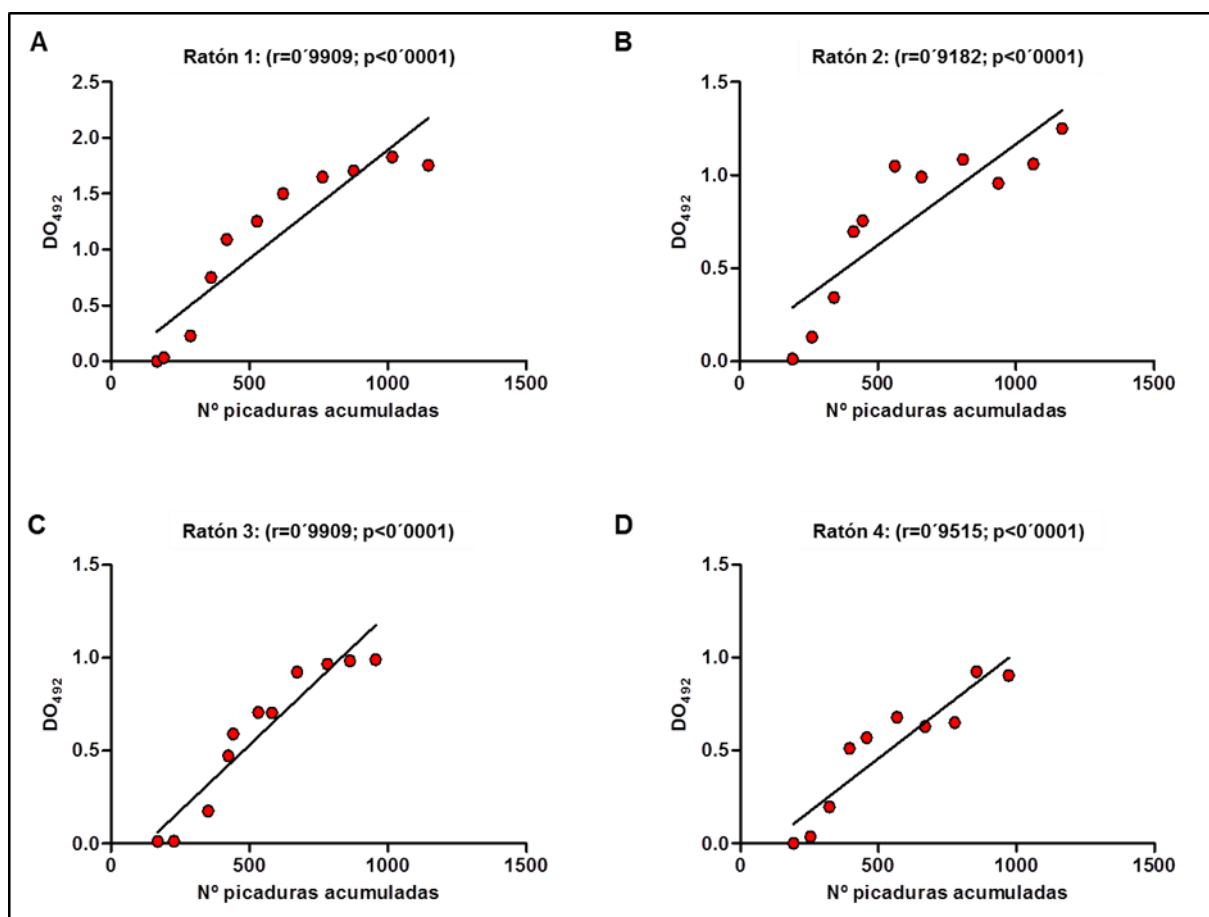
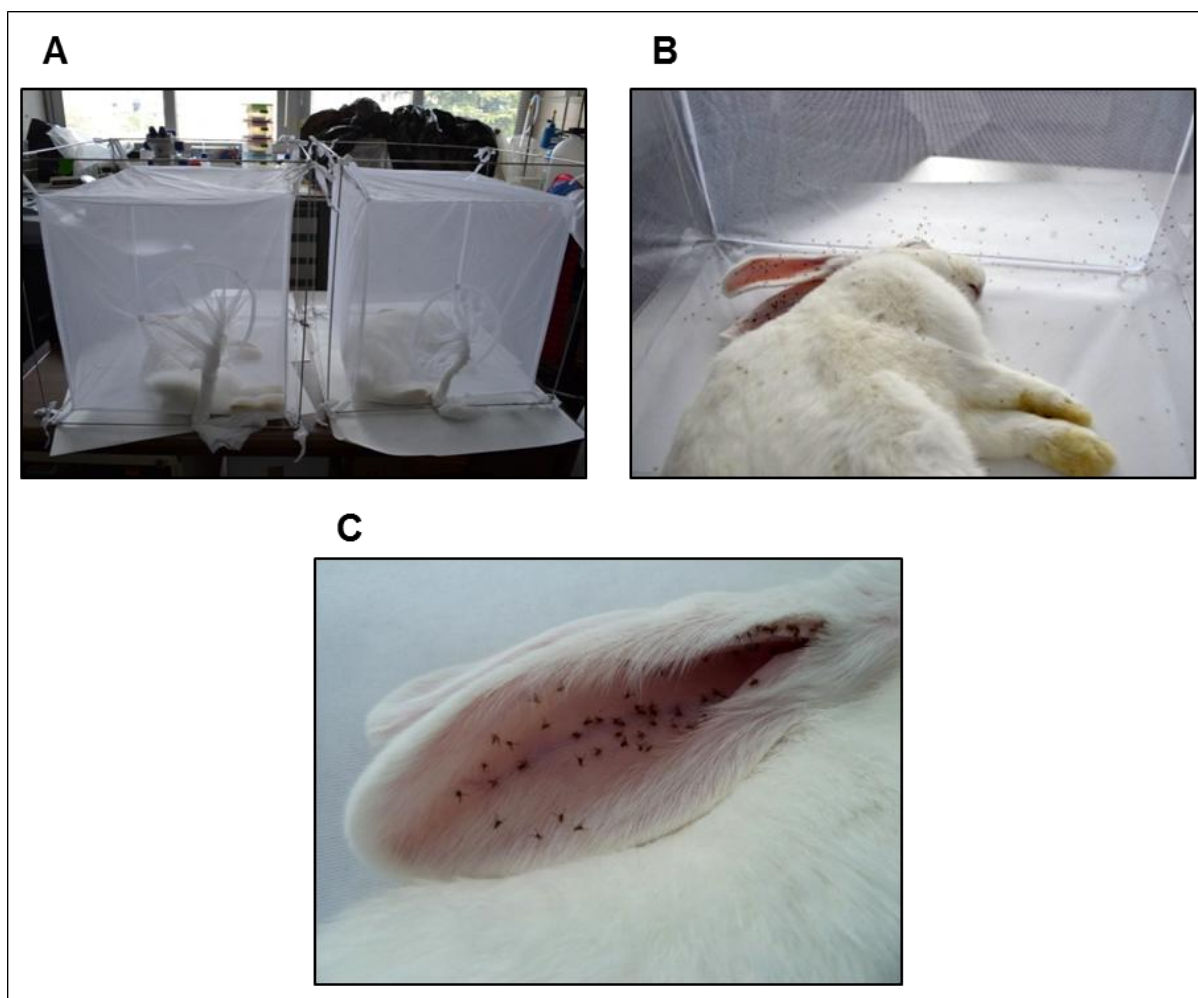


Figura 40. Relación entre el nivel de anticuerpos IgG antisaliva y el número de picaduras acumuladas en los ratones BALB/c. A) Ratón 1,  $r = 0.9909$ . B) Ratón 2,  $r = 0.9182$ . C) Ratón 3,  $r = 0.9909$  y D) Ratón 4,  $r = 0.9515$ .

#### 4.4.2 Cinética de anticuerpos antisaliva en conejos

Se estudió la cinética de los anticuerpos IgG antisaliva en los sueros de los conejos inmunizados, durante la exposición de los flebotomos y en las semanas posteriores (Apartado 3.2.6.1). En la Figura 41 se muestra el procedimiento de inmunización de los conejos con la saliva de *P. perniciosus*, a través de la picadura.



**Figura 41. Inmunización de conejos a través de la picadura de flebotomos. A) Conejos anestesiados en el interior de las jaulas junto con los flebotomos. B) Detalle de un conejo en el interior de la jaula. C) Flebotomos alimentándose de la oreja de un conejo.**

El porcentaje de los flebotomos alimentados sobre los conejos ascendió al 82'05%, quedando reflejados los datos individuales en la Tabla 29.

Tabla 29. Flebotomos alimentados sobre cada conejo.

Semana	C1	C2	C3	C4
S1	490	433	306	327
S2	487	436	438	428
S3	457	303	189	491
S4*	-	469	396	480
S5	-	366	-	-
S6	-	474	-	-
S7	-	449	-	-
S8	-	376	-	-
Total	1.434	3.306	1.329	1.726

\*El conejo 1 murió en la semana 4.

La detección de los anticuerpos antisaliva de tipo IgG en el suero de los conejos fue perceptible desde la segunda semana de inmunización, alcanzando valores de DO elevados ( $DO_{492} = 2.3$ ) (Figuras 42 y 43).

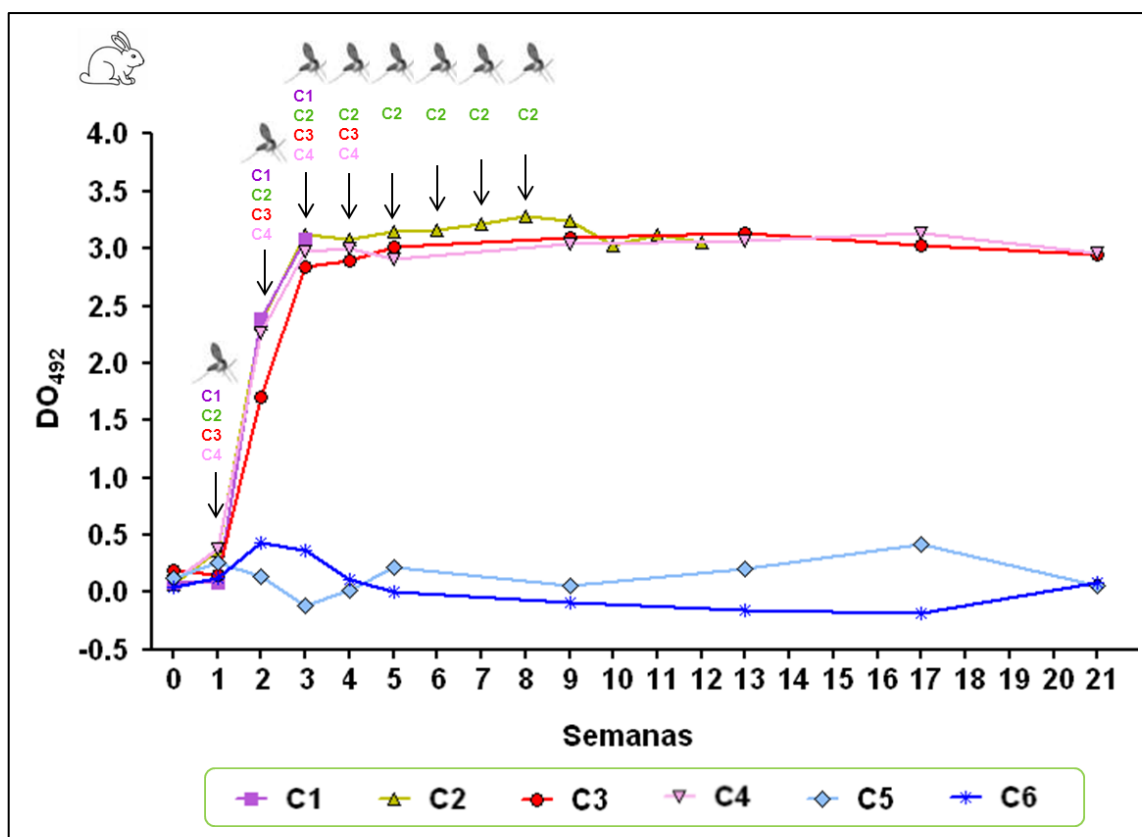


Figura 42. Cinética de anticuerpos IgG antisaliva en conejos. Nivel de anticuerpos de tipo IgG frente a la saliva de *P. perniciosus* a lo largo de la inmunización de los conejos. C5 y C6: conejos sin inmunizar.

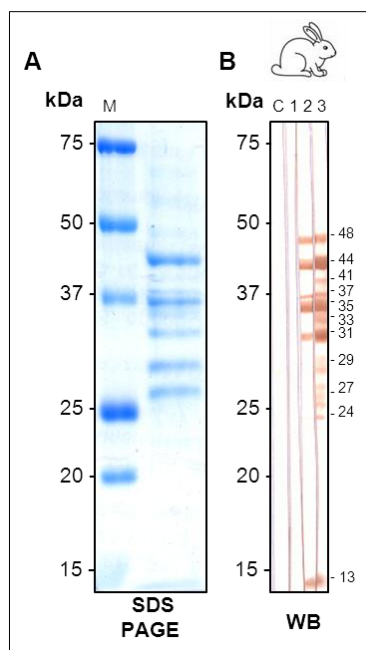


Indica la exposición de los conejos a las picaduras de *P. perniciosus*.



Tras este pronunciado ascenso inicial, los niveles de IgG antisaliva siguieron aumentando tras la siguiente inmunización (semana 3) y, a partir de entonces, se mantuvieron estabilizados en valores muy elevados durante toda la fase de exposición. Los cuatro conejos inmunizados presentaron valores de absorbancias muy similares durante las fases de inmunización y de seguimiento. Tras la inesperada muerte del conejo C1, el estudio de los niveles de IgG antisaliva en la fase de meseta sólo pudo ser completado con el conejo C2, del que se extrajo suero periódicamente durante las 4 semanas siguientes a la última exposición. Se pudo observar que el nivel de anticuerpos de tipo IgG se mantuvo constante con una casi imperceptible disminución. En un experimento complementario, se inmunizaron dos conejos durante 4 semanas (denominados C3 y C4) y, de forma paralela se utilizaron otros dos conejos como controles sin inmunizar (C5 y C6). En estos 4 conejos (C3 a C6) se prolongó la fase de seguimiento hasta 5 meses después de la última exposición (semana 21). Los niveles de IgG antisaliva permanecieron constantes durante los 5 meses después de la última exposición. En la Figura 42 se muestra la variación de los niveles de IgG antisaliva en el suero de los conejos a medida que progresan las inmunizaciones.

El reconocimiento específico de los anticuerpos antisaliva se confirmó por *WB*, utilizando los sueros del conejo C1 durante la fase inicial de la inmunización (semanas 1, 2 y 3). De forma similar a los resultados obtenidos mediante ELISA observamos que, tras la segunda inmunización, es cuando se hace patente la presencia de anticuerpos antisaliva en el suero del conejo y reconocen mayoritariamente las bandas proteicas de 13, 35, 37, 44 y 48 kDa. Una semana después, tras la tercera inmunización, los sueros reconocen también las bandas proteicas de 24, 27, 29, 33 y 41 kDa (Figura 43).



**Figura 43.** Reconocimiento de las proteínas de la saliva de *P. perniciosus* tras la separación electroforética monodimensional, utilizando los sueros del conejo C1. A) SDS-PAGE de 20 glándulas salivales de *P. perniciosus* en gel de poliacrilamida al 12,5% mediante tinción con azul de Coomassie coloidal. B) WB de las proteínas salivales de *P. perniciosus*. La membrana de PVDF (20 glándulas/carril) se cortó en 4 partes, incubadas con el suero preinmune (carril C) y con los sueros obtenidos tras la 1ª, 2ª y 3ª inmunización (carriles 1, 2 y 3, respectivamente). M: Marcador de peso molecular *Precision Plus Dual Xtra* (Bio-Rad®).

En el caso de los conejos, los niveles de IgG antisaliva también aumentan en concordancia con el número de picaduras acumuladas. Sin embargo, únicamente se encontró en el conejo C2 una correlación estadísticamente significativa ( $p=0.0046$ ) entre el nivel de IgG antisaliva y el número de picaduras acumuladas durante el periodo de inmunización ( $r=0.9048$ ). Para los conejos C1, C3 y C4 no se obtuvo una correlación significativa ya que el número de medidas era relativamente reducido ( $r=1$ ;  $p=0.3333$ ;  $r=1$ ;  $p=0.0833$  y  $r=1$ ;  $p=0.0833$ , respectivamente).

Se elaboró un registro de la mortalidad de las hembras alimentadas sobre los conejos el día posterior a la exposición de los flebotomos (Tabla 30).

**Tabla 30. Número de picaduras acumuladas en los conejos en cada proceso de inmunización y mortalidad de los flebotomos alimentados.**

Conejo 1				Conejo 2			
Nº de inmunización	Nº picaduras acumuladas	Flebotomos muertos		Nº de inmunización	Nº picaduras acumuladas	Flebotomos muertos	
		Nº	%			Nº	%
1ª	490	12	2'45	1ª	433	26	6'00
2ª	977	24	4'93	2ª	869	9	2'06
3ª	1434	18	3'94	3ª	1172	16	5'28
				4ª	1641	7	1'49
				5ª	2007	28	7'65
				6ª	2481	15	3'16
				7ª	2930	21	4'68
				8ª	3306	15	3'99

Conejo 3				Conejo 4			
Nº de inmunización	Nº picaduras acumuladas	Flebotomos muertos		Nº de inmunización	Nº picaduras acumuladas	Flebotomos muertos	
		Nº	%			Nº	%
1ª	306	11	3'59	1ª	497	13	3'96
2ª	744	12	2'74	2ª	1110	24	5'61
3ª	933	18	9'52	3ª	1558	14	2'85
4ª	1329	78	19'70	4ª	1903	175	36'46

Al igual que en el caso de los ratones y cricetos, no se encontró una relación entre el número de hembras no supervivientes y el avance de las inmunizaciones. La comparación entre la mortalidad de los flebotomos y el número de picaduras acumuladas se estableció para cada conejo mediante el test de Spearman, constatándose la ausencia de relación estadísticamente significativa ( $p > 0.05$  en todos los casos). De la misma manera, tampoco se pudo determinar una relación entre la mortalidad de los flebotomos y el incremento del nivel de anticuerpos antisaliva, en cada conejo ( $p > 0.05$ ).

## 4.5 Ensayos de reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la saliva de *P. perniciosus* y otras especies de flebotomos

### 4.5.1 Reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la saliva de *P. perniciosus* y *P. argentipes*.

El lote de sueros de cricetos inmunizados con la saliva de *P. perniciosus* (Apartado 3.2.6.1) no reconoció ninguna proteína de la saliva de *P. argentipes* mediante las dos técnicas estudiadas, ELISA y WB. De igual modo, las proteínas salivales de *P. perniciosus* no fueron reconocidas por los sueros de cricetos inmunizados mediante la picadura de *P. argentipes*, confirmándose la ausencia total de reactividad cruzada entre los anticuerpos IgG antisaliva de ambas especies de flebotomo (Figura 44A y B).

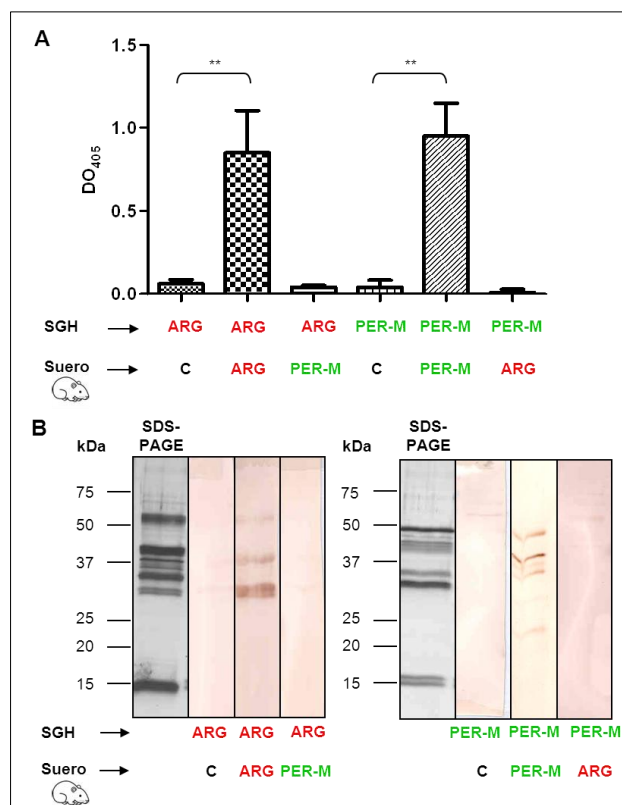


Figura 44. Estudio de la reactividad cruzada entre los anticuerpos salivales frente a *P. perniciosus* y *P. argentipes*. A) Detección mediante ELISA de los niveles de anticuerpos de tipo IgG en los sueros de cricetos inmunizados con la saliva de *P. perniciosus* de Madrid (PER-M) y *P. argentipes* (ARG) usando SGH de ambas especies. Niveles de anticuerpos expresados como la media de la densidad óptica ajustada. B) Reconocimiento de las proteínas salivales de PER-M y ARG por sueros de animales inmunizados con la saliva de PER-M y ARG, mediante WB (40 glándulas/carril) y su correspondiente gel teñido con plata (15 glándulas/carril). Carril C: Control. (\*\*):  $p < 0.01$ .

#### 4.5.2 Reactividad cruzada entre anticuerpos salivales de *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *L. longipalpis*.

Se emplearon sueros de ratones, inmunizados con la saliva de estas especies de flebotomos a través de la picadura, incubados de manera independiente con los extractos salivales de cada flebotomo. La técnica de ELISA demostró que el reconocimiento de las proteínas salivales por parte de los anticuerpos presentes en los sueros de ratones es específico (Figura 45).

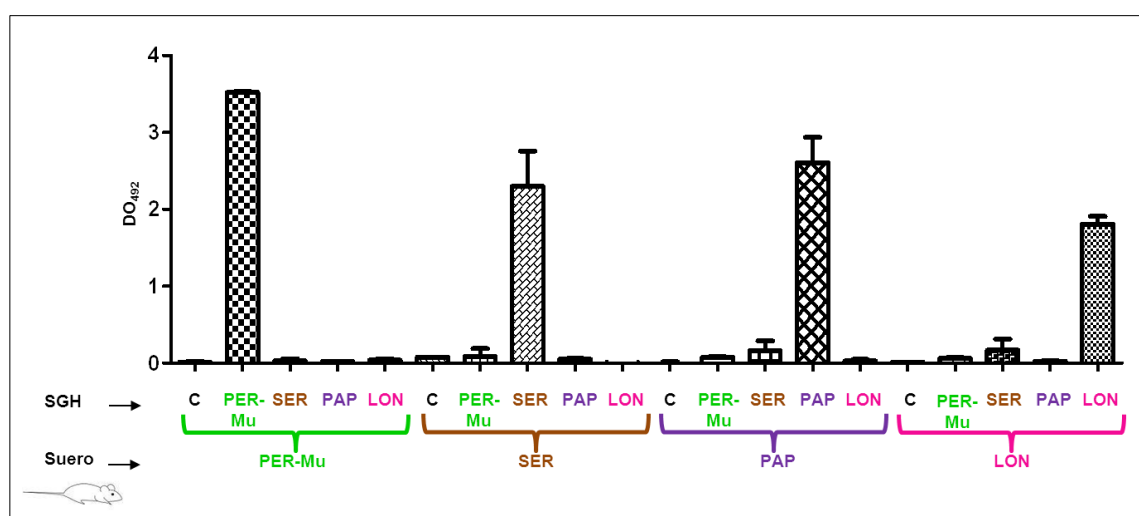
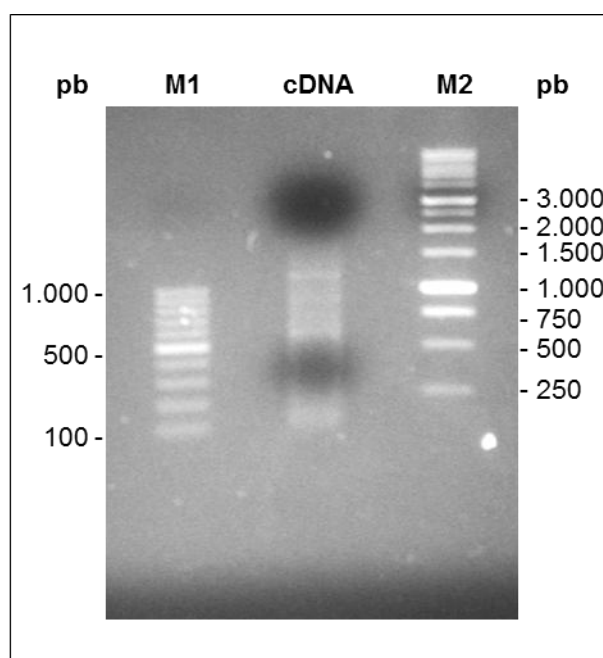


Figura 45. Estudio de la reactividad cruzada entre los anticuerpos salivales de *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *L. longipalpis*. Detección mediante ELISA de los niveles de anticuerpos de tipo IgG en los sueros de animales inmunizados con la saliva de *P. perniciosus* de Murcia (PER-Mu), *P. sergenti* (SER), *P. papatasi* (PAP) y *L. longipalpis* (LON), usando SGH de dichas especies. C: Control. El nivel de anticuerpos está expresado como la media de la densidad óptica ajustada de 2 sueros hiperinmunes de ratón *skh*.

#### 4.6 Análisis de la genoteca de expresión obtenida a partir de glándulas salivales de *P. perniciosus*.

La genoteca de expresión se construyó, de acuerdo al protocolo descrito en el Apartado 3.2.7.1, a partir de 165 glándulas salivales de hembras de *P. perniciosus* recién emergidas. Se obtuvieron 1.369´9 ng de ARNm con un cociente de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  de 2´29, de los cuales 500 ng se retrotranscribieron seguidamente a ADNc para evitar su degradación. Tras su amplificación por PCR, se visualizaron en un gel de agarosa como un conjunto de bandas con un rango de tamaño comprendido entre 100 y 2.500 pb, con algunas bandas prominentes de alrededor de 1.200, 950 y 700 pb, que se corresponden con los transcritos mayormente representados (Figura 46).



**Figura 46. Amplificación de los ADNc de las glándulas salivales de *P. perniciosus*. Electroforesis en gel de agarosa de 5 µl de producto de PCR de los ADNc obtenido mediante 20 ciclos de amplificación. M1: marcador de 100 pb. M2: Marcador de 1 Kb (Biotools®).**

Posteriormente se realizaron 2 empaquetamientos independientes con el mismo ADNc en el fago λTriplEx2 (Clontech®). Estos dos empaquetamientos se mezclaron a partes iguales y el conjunto resultante se amplificó (Apartado 3.2.7.3), dando lugar a la genoteca amplificada. Los datos de las genotecas no amplificadas y amplificada se detallan en la Tabla 31.

Tabla 31. Título y porcentaje de clones no recombinantes en las genotecas de expresión.

Empaquetamiento	Genoteca no amplificada		Genoteca amplificada	
	Título (ufp/ml)	% clones no recombinantes	Título (ufp/ml)	% clones no recombinantes
1	$2.01 \times 10^6$	23%	$1.2 \times 10^{12}$	1.92%
2	$5.19 \times 10^6$	12.28%		

Dado el elevado título de la genoteca amplificada, ésta se utilizó en el análisis y procesos de clonación recogidos en esta Tesis Doctoral. Se aislaron 201 halos de lisis de las placas que contenían los fagos crecidos en presencia de IPTG y X-Gal (Figura 47A). Se analizó por PCR el tamaño del inserto de estos 201 fagos y de los que presentaban el mayor tamaño se seleccionaron 34 para convertir de fago  $\lambda$ TriplEx2 a plásmido pTriplEx2 (Figura 47B).

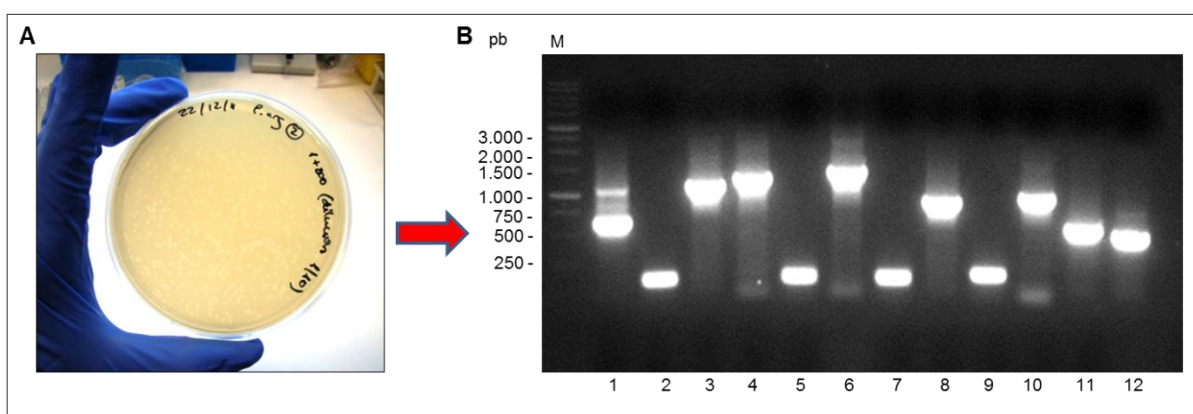


Figura 47. Análisis de la genoteca de ADNc de las glándulas salivales de *P. perniciosus*. A) Aislamiento de los halos de lisis correspondientes a las células bacterianas infectadas por los fagos. B) Determinación mediante amplificación por PCR del tamaño del inserto presente en dichos fagos. Los fagos 2, 5, 7 y 9 no son recombinantes y la banda detectada se corresponde con la amplificación de los nucleótidos del vector presentes entre los cebadores usados. M: Marcador de 1 Kb (Biotools®).

La secuenciación de los 34 plásmidos permitió la caracterización de 25 transcritos completos (74%), mayoritariamente identificados como apirasas (n=2, 4%), proteínas relacionadas con D7 (n=8, 32%) y proteínas similares a PpSP15 (n=13, 52%). Los 9 plásmidos restantes (26%) se correspondieron con secuencias truncadas de genes constitutivos de las glándulas y genes codificantes de las proteínas secretadas (apirasas, proteínas amarillas, proteínas relacionadas con D7, proteínas similares a lufaxina y proteínas similares a PpSP15), tal y como se muestra en la Tabla 32.

Tabla 32. Tránscrios aislados de la genoteca de las glándulas salivales de *P. perniciosus*.

	Completos	Incompletos	Total
<b>Apirasas</b>	2	1	<b>3 (9%)</b>
<b>Proteínas relacionadas con D7</b>	8	1	<b>9 (26%)</b>
<b>Proteínas similares a PpSP15</b>	13	1	<b>14 (41%)</b>
<b>Proteínas amarillas</b>	0	1	<b>1 (3%)</b>
<b>Proteínas similares a lufaxina</b>	1	1	<b>2 (6%)</b>
<b>Proteínas constitutivas</b>	1	4	<b>5 (15%)</b>
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>9</b>	<b>34</b>

En la Tabla 33 se detallan los resultados del análisis de las secuencias y los estudios de búsqueda de similitudes en las bases de datos.



Tabla 33. Información detallada de los transcritos aislados de la genoteca de las glándulas salivales de *P. perniciosus*.

Transcrito	Plásmido	Similitud con otras secuencias nucleotídicas en las bases de datos						Observaciones	CDS (Completo / Incompleto)	Péptido señal
		Nombre	Nº acceso GenBank	Especie	e value	Identidad	Saltos (Gaps)			
1	p102	SP01B	DQ192491	<i>P. perniciosus</i>	0'0	1067/1090 (98%)	7/1090	Apirasa	Completo	Sí
2	p105	SP04B	DQ150624	<i>P. perniciosus</i>	0'0	761/824 (92%)	2/824	Relacionada con D7	Completo	Sí
3	p114	SP04	DQ150623	<i>P. perniciosus</i>	0'0	821/838 (98%)	0/838	Relacionada con D7	Completo	Sí
4	p119	-	XM_001663068	<i>Ae. aegypti</i>	2.e <sup>-129</sup>	462/496 (81%)	0/496	Desconocida	Completo	No
5	p124	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	513/522 (98%)	0/496	Similar a PpSP15	Completo	Sí
6	p127	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	503/512 (98%)	6/512	Similar a PpSP15	Completo	Sí
7	p131	SP09	DQ153103	<i>P. perniciosus</i>	0'0	477/500 (95%)	0/500	Similar a PpSP15	Completo	Sí
8	p132	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	513/523 (98%)	1/523	Similar a PpSP15	Completo	Sí
9	p134	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	511/524 (98%)	2/254	Similar a PpSP15	Completo	Sí
10	p136	SP04	DQ150623	<i>P. perniciosus</i>	0'0	814/833 (98%)	0/833	Relacionada con D7	Completo	Sí
11	p142	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	513/522 (98%)	1/522	Similar a PpSP15	Completo	Sí
12	p104	-	EU047548	<i>P. papatasi</i>	4. e- 112	318/373 (85%)	7/373	Proteína ribosomal 60S	Incompleto	No
13	p133	SP04B	DQ150624	<i>P. perniciosus</i>	9. e <sup>-73</sup>	219/254 (86%)	10/254	Relacionada con D7	Incompleto	Sí
14	p140	-	EU045337	<i>P. papatasi</i>	1. e <sup>-83</sup>	239/281 (85%)	15/281	Proteína ribosomal 40S	Incompleto	No
15	p145	-	AL844503	<i>P. falciparum</i> *	6. e <sup>-8</sup>	39/40 (98%)	0/40	Proteína ribosomal	Incompleto	No
16	p158	SP11	DQ153105	<i>P. perniciosus</i>	0'0	458/483 (95%)	10/483	Similar a PpSP15	Completo	Sí
17	p159	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	514/523 (98%)	1/523	Similar a PpSP15	Completo	Sí
18	p163	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	513/522 (98%)	0/522	Similar a PpSP15	Completo	Sí
19	p164	SP03B	DQ150622	<i>P. perniciosus</i>	0'0	424/439 (97%)	2/439	Proteína amarilla	Incompleto	Sí

\* *P. falciparum* = *Plasmodium falciparum*

Tabla 33. Continuación.

Tránsito	Plásmido	Similitud con otras secuencias nucleotídicas en bases de datos						Observaciones	CDS (Completo / Incompleto)	Péptido señal
		Nombre	Nº acceso GenBank	Especie	e value	Identidad	Salto (Gaps)			
20	p174	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	513/522 (98%)	1/522	Similar a PpSP15	Completo	Sí
21	p175	-	XM_001237520	<i>Anopheles gambiae</i>	6. e- <sup>15</sup>	195/287 (68%)	32/287	Desconocida	Incompleto	No
22	p179	SP06	DQ153100	<i>P. perniciosus</i>	1. e- <sup>164</sup>	346/358 (97%)	1/358	Lufaxina	Incompleto	Sí
23	p190	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	505/517 (98%)	2/517	Similar a PpSP15	Completo	Sí
24	p192	SP11	DQ153105	<i>P. perniciosus</i>	0'0	453/474 (96%)	10/474	Similar a PpSP15	Incompleto	Sí
25	p220	SP06	DQ153100	<i>P. perniciosus</i>	0'0	1011/1031 (98%)	1/1031	Lufaxina	Completo	Sí
26	p223	SP04	DQ150623	<i>P. perniciosus</i>	0'0	812/831 (98%)	4/831	Relacionada con D7	Completo	Sí
27	p225	SP01B	DQ192491	<i>P. perniciosus</i>	0'0	1095/1126 (97%)	23/1126	Apirasa	Completo	Sí
28	p229	SP01B	DQ192491	<i>P. perniciosus</i>	0'0	984/1000 (98%)	2/1000	Apirasa	Incompleto	Sí
29	p231	SP04	DQ150623	<i>P. perniciosus</i>	0'0	760/782 (97%)	4/782	Relacionada con D7	Completo	Sí
30	p236	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	511/525 (97%)	3/525	Similar a PpSP15	Completo	Sí
31	p239	SP04	DQ150623	<i>P. perniciosus</i>	0'0	790/818 (97%)	7/818	Relacionada con D7	Completo	Sí
32	p241	SP04	DQ150623	<i>P. perniciosus</i>	0'0	817/837 (98%)	4/837	Relacionada con D7	Completo	Sí
33	p250	SP02	DQ150620	<i>P. perniciosus</i>	0'0	514/522 (98%)	0/522	Similar a PpSP15	Completo	Sí
34	p136	SP04	DQ150623	<i>P. perniciosus</i>	0'0	819/837 (98%)	3/837	Relacionada con D7	Completo	Sí

Identidad con otras secuencias en las bases de datos analizada mediante BLASTn. El valor esperado (e value) indica la probabilidad de que el resultado arrojado por el programa BLAST se deba al azar. Cuanto menor es ese valor, mayor será la fiabilidad de los resultados. Los saltos o gaps indican los espacios introducidos en las secuencias para optimizar los alineamientos. La presencia de péptido señal se estudió con el programa Signal P.

Adicionalmente, se aislaron los ADNc completos de algunos genes de interés (SP01, SP03B y SP08) que no se habían encontrado en el análisis de clones al azar de la genoteca. Estos genes se amplificaron directamente por PCR, utilizando la genoteca amplificada como ADN molde (Figura 54) y fueron posteriormente clonados en el vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>.

Se secuenciaron ambas hebras de ADN, tanto de los ADNc aislados de los plásmidos pTriplEx2 como de los ADNc amplificados directamente de la genoteca. Las secuencias completas fueron anotadas en la base de datos de EMBL (*The European Molecular Biology Laboratory*) y los números de acceso se detallan en la Tabla 34. Las secuencias obtenidas se compararon con las previamente anotadas en las bases de datos, procedentes de *P. perniciosus* originarios de Italia (Anderson y col., 2006). Como resultado global, se constata un elevado grado de conservación entre los genes de ambas genotecas.

Se identificaron diversos polimorfismos en la zona de ADN codificante, y posteriormente se realizó un análisis de la predicción de los cambios de estructura de las proteínas mediante modelos *in silico* de la localización de las regiones alfa y beta, antigenicidad, sitios de fosforilación y glicosilación de las secuencias de las proteínas codificadas por los genes secuenciados de nuestra genoteca y las correspondientes proteínas concordantes en las bases de datos. Este análisis detectó diversos polimorfismos responsables de potenciales cambios en estructura, inmunogenicidad o sitios de fosforilación y glicosilación (Tabla 34).

**Tabla 34. Estudio de los polimorfismos entre los ADNc completos secuenciados de la genoteca de glándulas salivales de *P. perniciosus* y las secuencias previamente anotadas en las bases de datos (Anderson y col., 2006).**

Nombre de la secuencia (Nº acceso NCBI)	Similitud con otras proteínas en bases de datos	Familia de proteínas	Polimorfismos nucleotídicos		Polimorfismos aminoacídicos		Cambios en sitios de glicosilación		Cambios en sitios de fosforilación	Cambios en la estructura de la proteína
			UTRs	CDS	Regiones antigénicas	Regiones no antigénicas	N	O		
SP01 (HE974344)	PperSP01 (DQ192490)	Apirasa	0	17	1	1	No	No	Sí	No
SP01B (HE974345)	PperSP01B (DQ192491)	Apirasa	3	8	4	2	No	No	Sí	Sí
SP02 (HE985074)	PperSP02 (DQ150620)	Similar a PpSP15	3	6	2	1	No	No	Sí	No
SP02 (HE985075)	PperSP02 (DQ150620)	Similar a PpSP15	3	6	3*	0 *	No	No	Sí	Sí
SP02 (HE985076)	PperSP02 (DQ150620)	Similar a PpSP15	2	9	5	1	No	No	Sí	No
SP02 (HE985077)	PperSP02 (DQ150620)	Similar a PpSP15	1	10	4	1	No	No	Sí	No
SP03B (HE974346)	PperSP03B(DQ150622)	Proteína amarilla	0	17	4	4	No	No	Sí	Sí
SP04 (HE980444)	PperSP04 (DQ150623)	Relacionada con D7	5	12	4	1	No	No	No	No
SP04B (HE980443)	PperSP04B (DQ150624)	Relacionada con D7	9	52	22	5	No	No	Sí	Sí
SP06 (HE970770)	PperSP06 (DQ153100)	Similar a lufaxina	8	11	3	1	No	No	Sí	Sí
SP08 (HE974347)	PperSP08 (DQ153102)	Similar a ParaSP25	0	8	3	1	No	No	Sí	Sí
SP09 (HE966456)	PperSP09 (DQ153103)	Similar a PpSP15	7	16	8	1	No	No	Sí	Sí
SP11 (HE974348)	PperSP11 (DQ153105)	Similar a PpSP15	11	4	1	0	No	No	No	No
Proteína hipotética P119 (HE985078)	Proteína hipotética <i>Ae. aegypti</i> (XM_001663068)	Desconocida	18	76	8	1	No	Sí	Sí	Sí

**Los polimorfismos nucleotídicos presentes en la región de ARN no transcrita (UTR) y la secuencia de ADN codificante (CDS) se analizaron mediante BLASTn. La localización de los polimorfismos aminoacídicos se analizaron mediante ClustalW y la asignación de zonas antigénicas se elaboró estudiando el índice de Jameson-Wolf, programa Protean, DNASTar, Lasergene. Los cambios en la estructura de las proteínas se establecieron comparando las predicciones de las secuencias, usando el algoritmo de Garnier-Robson (programa Protean, DNASTAR, Lasergene).**

**\*Dos delecciones en la secuencia nucleotídica de SP02 (HE985075) dan lugar a un cambio en el marco de lectura del gen.**

La secuencia del transcrito que codifica la apirasa SP01B en nuestra genoteca está conservada con sus respectivos genes de *P. perniciosus* de Italia (Figura 48).

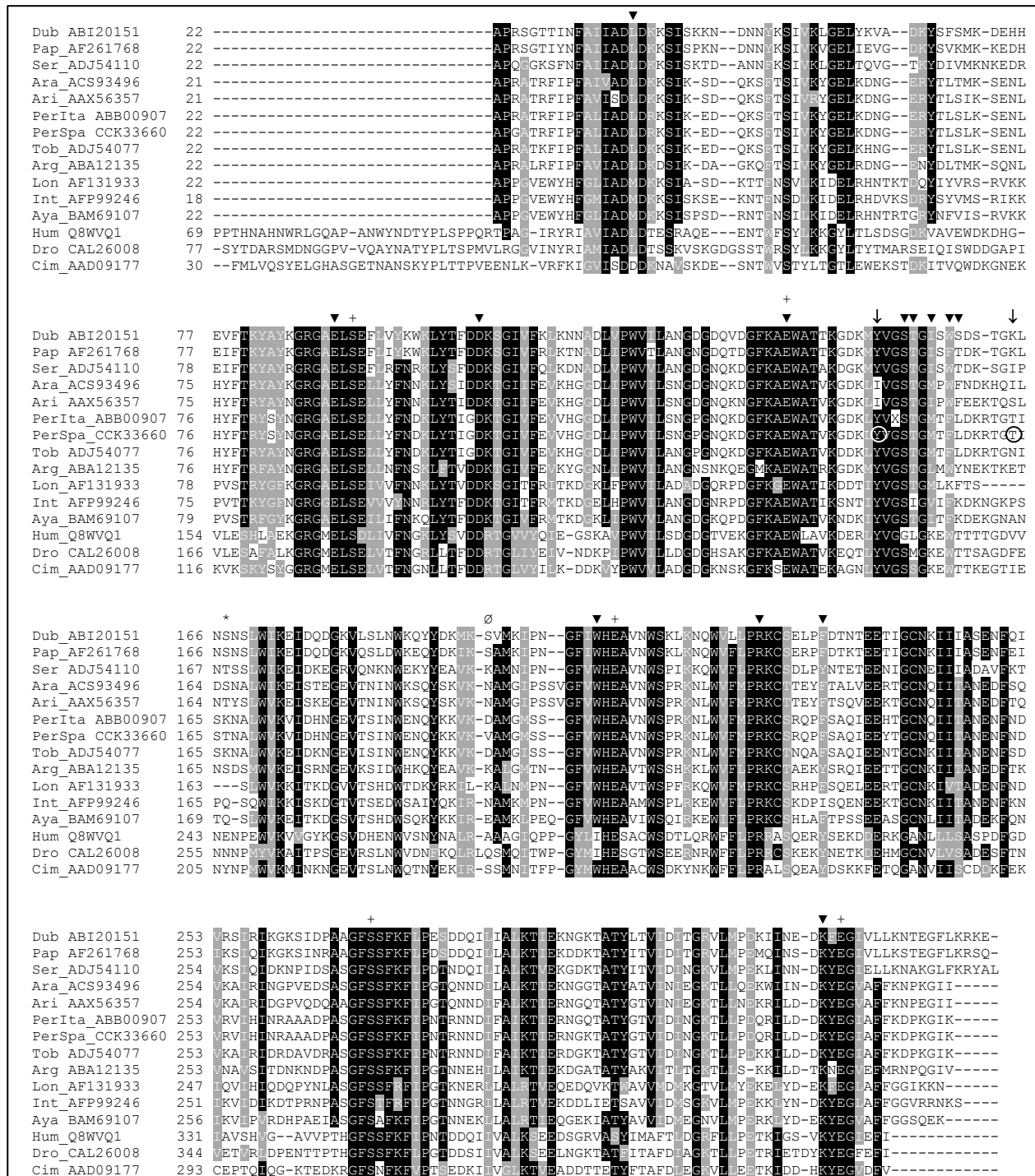


Figura 48. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de apirases de flebotomos y otras secuencias relacionadas: *L. longipalpis* (Lon), *L. intermedia* (Int), *L. ayacuchensis* (Aya), *P. arabicus* (Ara), *P. ariasi* (Ari), *P. perniciosus* de Italia (PerIta), *P. perniciosus* de España (PerSpa), *P. tobbi* (Tob), *P. argentipes* (Arg), *P. duboscqi* (Dub), *P. papatasi* (Pap), *P. sergenti* (Ser), *Homo sapiens* (Hum), *D. melanogaster* (Dro), *C. lectularius* (Cim). (\*) y (Ø): Cambios en la predicción del índice antigénico y en la estructura secundaria entre PerSpa y PerIta. (□): Cambios en la predicción de los sitios de fosforilación, el aminoácido afectado aparece rodeado por un círculo. (▼) y (+): Sitios de unión de nucleótidos y  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente.

El 67% de los transcritos aislados de la genoteca se corresponden con proteínas de la superfamilia de unión a sustancias olorosas (OBP)/D7.

La secuencia nucleotídica que compone la proteína relacionada con D7, SP04B (GenBank: HE980443), mostró dos delecciones entre T<sub>546</sub> y A<sub>547</sub> que provocarían un cambio en el marco de lectura del gen, dando lugar a un codón de parada anterior (<sub>546</sub>TAG<sub>548</sub>) (Figura 49).

PerIta DQ150624	1	CTTGCTTTGTGTATTGTTGAGTTTAGGCGAATTAGGGTATTCTTG	SCAGTACCCTAGAAATGCCGATCAAACCTCTTTGGGCTTTC	CGATC
PerSpa HE980443.1	71	-----	SCAGTACCCTAGAAATGCCGATCAAACCTCTTTGGGCTTTC	CGATC
PerIta DQ150624	91	GTCCCAAAGAGAAGC	AAAAATCCGGATTAGTGAAAAAGTGGATGAATTGGGAACTACCAAT	CATAGGGAACTCATTGCTACGTTAA
PerSpa HE980443.1	116	GTCTCAAAGAGAAGC	AAAAATCCGGATTAGTGAAAAAGTGGATGAATTGGGAACTACCAAT	CATAGGGAACTCATTGCTACGTTAA
PerIta DQ150624	181	GTCCGTTTCGAT	CCATTTAGGATCCTACACCAACAA	GCATTCATTAAAGATTGATAAAGTGAAAAATCAATTTCGTCACGGGGTCT
PerSpa HE980443.1	206	GTGCATTTTGAC	CCATTTAGGATCCTACACCAACAA	GCATTCATTAAAGATTGATAAAGTGAAAAATCAATTTCGTCACGGGGTCT
PerIta DQ150624	271	ACAAATTCACCT	CAATTAGAAAAATAGCTGGACCTACAACTGGATCTTGTAAGACGTTACGAC	AAAACTATCGCTTTCTTAAAAG
PerSpa HE980443.1	226	ACATATTCAGTC	GGGTTAAGAAAACTAGCTGGACCTACAACTGGATCTTGTAAGACGTTACGAC	AAAACTATCGATTTTCTTAAAAG
PerIta DQ150624	361	CCAGAAGACAAACTTACAGAAAGCGTATTTATGGAAC	TAAGGAAGATTCCAACAAATGGTACTCAGAAAAATCCC	ATACCAAACCCAAAGGG
PerSpa HE980443.1	296	CCAGAAGACAAACTTACAGAAAGCGTATTTATGGAAC	TAAGGAAGATTCCAACAAATGGTACTCAGAAAAATCCC	ATACCAAACCCAAAGGG
PerIta DQ150624	451	AACGAANATTTCTGTATTCTGCAAGA	CAAAAAATCGCGAAGGTGGAAAGGAAGGAAC	TGCAAGCATTCCTGGAGCATGTACTACTATCG
PerSpa HE980443.1	476	AATGAAGATTTCTGTATTCTGCAAGA	CAAAAAATCGCGAAGGTGGAAAGGAAGGAAC	TGCAAGCATTCCTGGAGCATGTACTACTATCG
PerIta DQ150624	541	CTTAGTCGATGAGGATAATCTTGTGAT	CCCTTCAGGAAGTTGCCAGG	CATCTCAGAGCTGTATCTTAAAGAATGCAGGGATGCCGCTAG
PerSpa HE980443.1	564	TTTAGTCGATGAGGATAATCTTGTGAT	CCCTTCAGGAAGTTGCCAGG	CATCTCAGAGCTGTATCTTAAAGAATGCAGGGATGCCGCTAG
PerIta DQ150624	631	CAAGAAAAC	TGGATGCAAAAGTGGCCGATGAAATATATGAATGTCTTCATAATGTAAATCGTAAAGGTTTGAAGACGCTTTGAAGAAGTT	
PerSpa HE980443.1	654	CAAGAAAAC	TGGATGCAAAAGTGGCCGATGAAATATATGAATGTCTTCATAATGTAAATCGTAAAGGTTTGAAGACGCTTTGAAGAAGTT	
PerIta DQ150624	721	GGATGGTGAATCAGCCGTATATTA	AAAAATGAAATAAAATGTTTCTGCAAT	CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-
PerSpa HE980443.1	744	GGATGGTGAATCAGCCGTATATTA	AAAAATGAAATAAAATGTTTCTGCAAT	CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Figura 49. Alineamiento nucleotídico de SP04B de *P. perniciosus* de España (PerSpa) y SP04B de *P. perniciosus* de Italia (PerIta). El codón de parada anterior se muestra encuadrado en rojo.**

Con el fin de comprobar que todos los clones SP04B presentes en nuestra genoteca portaban esta mutación, se amplificó el gen SP04B con los cebadores que flanquean la zona codificante (SP04BF*Sa*I: GAGAGAGTCGACATGAACGCTTTATTC y SP04BR*Sa*I: GAGA GAGTCGACTTAATATACGGC), tomando como ADN molde la genoteca. El producto de amplificación presentó el tamaño esperado para la SP04B (758 pb) y la secuenciación de este ADN resultó en la identificación del ADNc sin delecciones que codifica la proteína traducida SP04B completa. Estos resultados confirman que en nuestra genoteca ambos clones están presentes.

La secuencia del transcrito que codifica una de las proteínas relacionadas con D7 de *P. perniciosus* de España (SP04; GenBank: CCK73754), presenta diversos residuos cisteína

conservados entre las secuencias de las proteínas D7 salivales de diferentes dípteros. Se observan polimorfismos en aminoácidos posiblemente implicados en la unión a leucotrienos y estabilización de análogos de tromboxano A2 (en posiciones R<sup>51</sup> y F<sup>64</sup>; Figura 50).

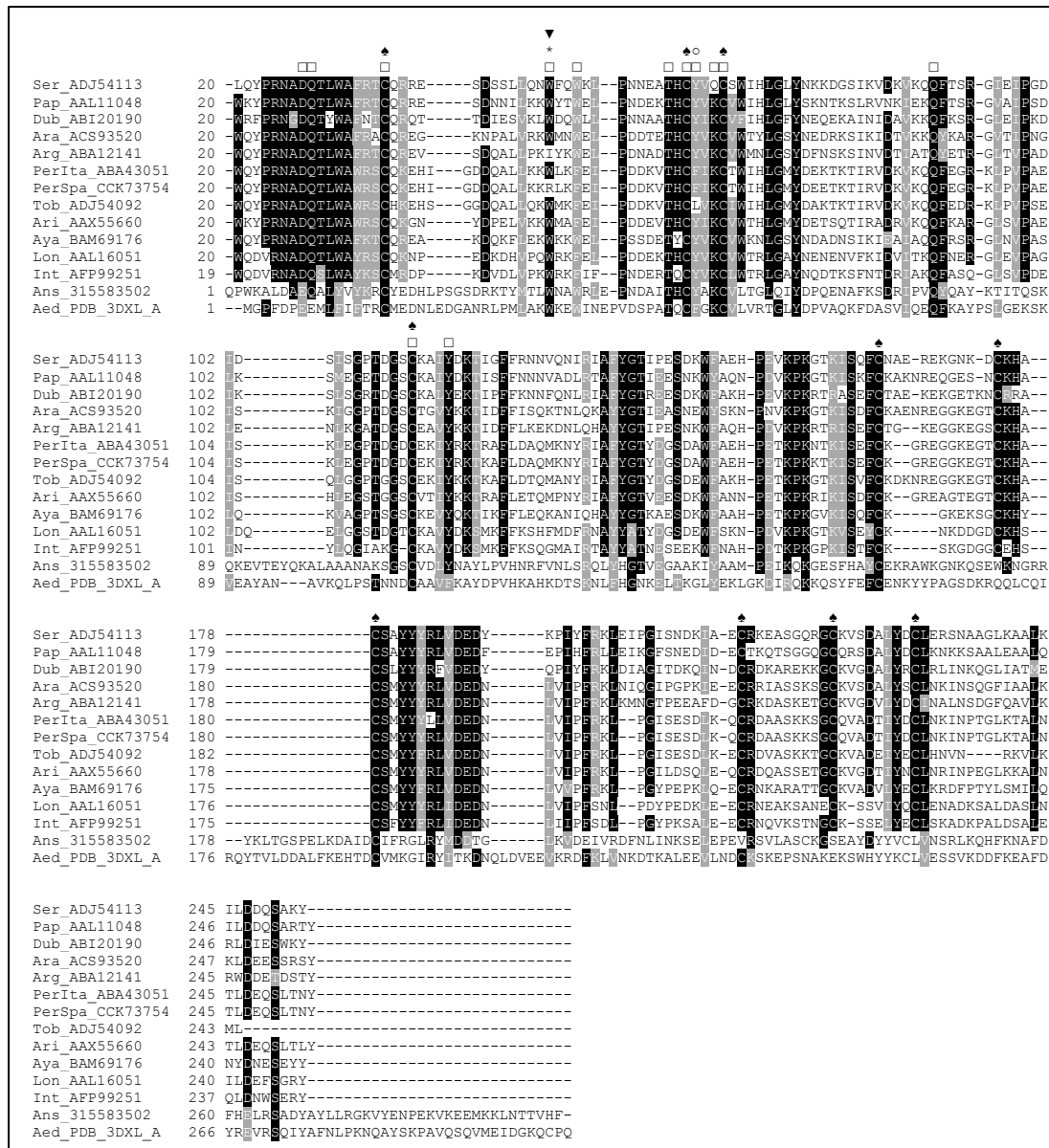


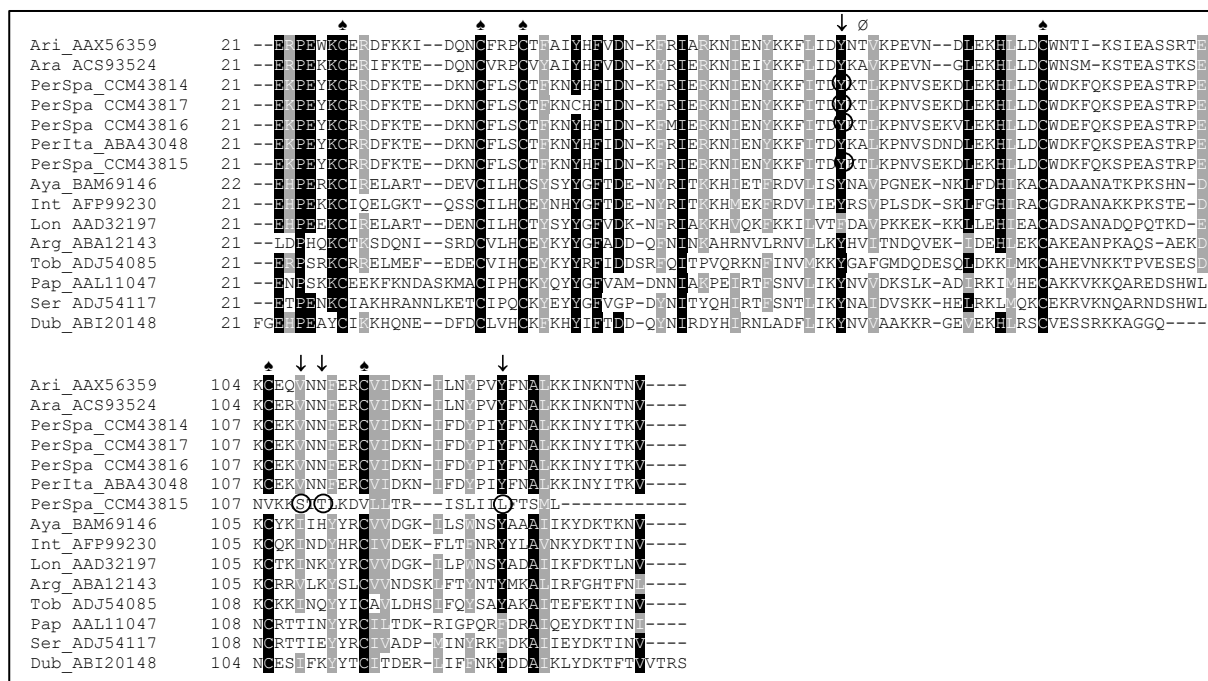
Figura 50. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de proteínas relacionadas con D7 de flebotomos y otras secuencias relacionadas: *L. longipalpis* (Lon), *L. intermedia* (Int), *L. ayacuchensis* (Aya), *P. arabicus* (Ara), *P. ariasi* (Ari), *P. perniciosus* de Italia (PerIta), *P. perniciosus* de España (PerSpa), *P. tobbi* (Tob), *P. argentipes* (Arg), *P. duboscqi* (Dub), *P. papatasi* (Pap), *P. sergenti* (Ser), *Anopheles stephensi* (Ans), *Ae. aegypti* (Aed). (\*): Cambios en la predicción del índice antigénico entre PerSpa y PerIta. (▲): Residuos conservados de cisteína. (□): Motivo de unión a cisteinil leucotrienos. (▼): Polimorfismo en R<sup>51</sup> respecto al aminoácido triptófano en el motivo de unión a leucotrienos. (○): Polimorfismo en F<sup>64</sup> respecto al aminoácido tirosina en posición Y<sup>52</sup> de *An. stephensi*, implicado en la estabilización de tromboxano A2.

Un 41% de los transcritos aislados de la genoteca fueron identificados como proteínas similares a PpSP15, pertenecientes a la superfamilia de unión a sustancias olorosas. Se aislaron varios genes codificantes de SP02 en la genoteca (GenBank: HE985074; HE985075; HE985076; HE985077), SP09 (GenBank: HE966456) y SP11 (GenBank: HE974348). Se identificaron varios polimorfismos a nivel nucleotídico (Tabla 33, Figura 51) y aminoacídico (Figura 52). Uno de los clones secuenciados de SP02 (GenBank: HE985075) presentó una delección de un sólo nucleótido, entre A<sub>340</sub> y T<sub>341</sub>, lo que ocasiona un cambio en el marco de lectura del gen, de ahí que su correspondiente proteína hipotética (CCM43815) difiera en secuencia y longitud respecto al resto de clones SP02 (Figuras 51 y 52), al contener un codón interno de parada (<sub>417</sub>TGA<sub>419</sub>).

PerIta	DQ150620.1	60	CTTCTGATCGCAAAATGTCGATCAGAAAAACCGGAATATAAGTGCCGCAGAGACTTCAAGACCGAGGATAAAAAATGCTTCCTTTCTTG
PerSpa	HE985074.1	57	CTTCTGATCGCAAAATGTCGATCAGAAAAACCGGAATATAAGTGCCGCAGAGACTTCAAGACCGAGGATAAAAAATGCTTCCTTTCTTG
PerSpa	HE985075.1	58	CTTCTGATCGCAAAATGTCGATCAGAAAAACCGGAATATAAGTGCCGCAGAGACTTCAAGACCGAGGATAAAAAATGCTTCCTTTCTTG
PerSpa	HE985076.1	57	CTTCTGATCGCAAAATGTCGATCAGAAAAACCGGAATATAAGTGCCGCAGAGACTTCAAGACCGAGGATAAAAAATGCTTCCTTTCTTG
PerSpa	HE985077.1	57	CTTCTGATCGCAAAATGTCGATCAGAAAAACCGGAATATAAGTGCCGCAGAGACTTCAAGACCGAGGATAAAAAATGCTTCCTTTCTTG
PerIta	DQ150620.1	151	TACATTTAAAAATTACCACTTCATTGATAACAAGTTCAGGATTGAAAGGAAGAATATTGAAAACACAAGAGTTCATAACTGACTATAA
PerSpa	HE985074.1	148	TACATTTAAAAATTACCACTTCATTGATAACAAGTTCAGGATTGAAAGGAAGAATATTGAAAACACAAGAGTTCATAACTGACTATAA
PerSpa	HE985075.1	149	TACATTTAAAAATTACCACTTCATTGATAACAAGTTCAGGATTGAAAGGAAGAATATTGAAAACACAAGAGTTCATAACTGACTATAA
PerSpa	HE985076.1	148	TACATTTAAAAATTACCACTTCATTGATAACAAGTTCAGGATTGAAAGGAAGAATATTGAAAACACAAGAGTTCATAACTGACTATAA
PerSpa	HE985077.1	148	TACATTTAAAAATTACCACTTCATTGATAACAAGTTCAGGATTGAAAGGAAGAATATTGAAAACACAAGAGTTCATAACTGACTATAA
PerIta	DQ150620.1	241	GACCTGAAACCCCAATGTTAGTGAAGGATTGGAAAAACACCTGTTGGATTGTTGGGATAAAATCCAAAAATCGCTGAAGCATCAAC
PerSpa	HE985074.1	238	GACCTGAAACCCCAATGTTAGTGAAGGATTGGAAAAACACCTGTTGGATTGTTGGGATAAAATCCAAAAATCGCTGAAGCATCAAC
PerSpa	HE985075.1	239	GACCTGAAACCCCAATGTTAGTGAAGGATTGGAAAAACACCTGTTGGATTGTTGGGATAAAATCCAAAAATCGCTGAAGCATCAAC
PerSpa	HE985076.1	238	GACCTGAAACCCCAATGTTAGTGAAGGATTGGAAAAACACCTGTTGGATTGTTGGGATAAAATCCAAAAATCGCTGAAGCATCAAC
PerSpa	HE985077.1	238	GACCTGAAACCCCAATGTTAGTGAAGGATTGGAAAAACACCTGTTGGATTGTTGGGATAAAATCCAAAAATCGCTGAAGCATCAAC
PerIta	DQ150620.1	331	AAGGCCCGAAAAATGTGAAAAAGTCAACAACCTTTGAAAGATGTGTTATTGACAAGAATATCTTTGATTATCCTATTTACTTCAATGCTTT
PerSpa	HE985074.1	328	CAGGCCCGAAAAATGTGAAAAAGTCAACAACCTTTGAAAGATGTGTTATTGACAAGAATATCTTTGATTATCCTATTTACTTCAATGCTTT
PerSpa	HE985075.1	329	CAGGCCCGAAAAATGTGAAAAAGTCAACAACCTTTGAAAGATGTGTTATTGACAAGAATATCTTTGATTATCCTATTTACTTCAATGCTTT
PerSpa	HE985076.1	328	CAGGCCCGAAAAATGTGAAAAAGTCAACAACCTTTGAAAGATGTGTTATTGACAAGAATATCTTTGATTATCCTATTTACTTCAATGCTTT
PerSpa	HE985077.1	328	CAGGCCCGAAAAATGTGAAAAAGTCAACAACCTTTGAAAGATGTGTTATTGACAAGAATATCTTTGATTATCCTATTTACTTCAATGCTTT
PerIta	DQ150620.1	421	GAAGAAAAATAATTACATTACAAAGGTTTAAATGAAAAATTGATGAAATAAACATAATGAATTATTGCATTGAATAA-CAAAA-AAAAAA
PerSpa	HE985074.1	418	GAAGAAAAATAATTACATTACAAAGGTTTAAATGAAAAATTGATGAAATAAACATAATGAATTATTGCATTGAATAA-CAAAA-AAAAAA
PerSpa	HE985075.1	418	GAAGAAAAATAATTACATTACAAAGGTTTAAATGAAAAATTGATGAAATAAACATAATGAATTATTGCATTGAATAA-CAAAA-AAAAAA
PerSpa	HE985076.1	418	GAAGAAAAATAATTACATTACAAAGGTTTAAATGAAAAATTGATGAAATAAACATAATGAATTATTGCATTGAATAA-CAAAA-AAAAAA
PerSpa	HE985077.1	421	GAAGAAAAATAATTACATTACAAAGGTTTAAATGAAAAATTGATGAAATAAACATAATGAATTATTGCATTGAATAA-CAAAA-AAAAAA
PerIta	DQ150620.1	508	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----
PerSpa	HE985074.1	506	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----
PerSpa	HE985075.1	506	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----
PerSpa	HE985076.1	506	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----
PerSpa	HE985077.1	508	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----

Figura 51. Alineamiento nucleotídico de proteínas similares a PpSP15 de *P. perniciosus* de España (PerSpa) y *P. perniciosus* de Italia (PerIta). El codón de parada anterior se muestra encuadrado en rojo.





**Figura 52. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas codificantes de proteínas similares a PpSP15: *L. longipalpis* (Lon), *L. intermedia* (Int), *L. ayacuchensis* (Aya), *P. arabicus* (Ara), *P. ariasi* (Ari), *P. perniciosus* de Italia (PerIta), *P. perniciosus* de España (PerSpa), *P. tobbi* (Tob), *P. argentipes* (Arg), *P. duboscqi* (Dub), *P. papatasi* (Pap) y *P. sergenti* (Ser). (∅): Cambios en la predicción de la estructura secundaria entre PerSpa y PerIta. (↓): Cambios en la predicción de los sitios de fosforilación, el aminoácido afectado aparece por un círculo. (♠): Residuos conservados de cisteína.**

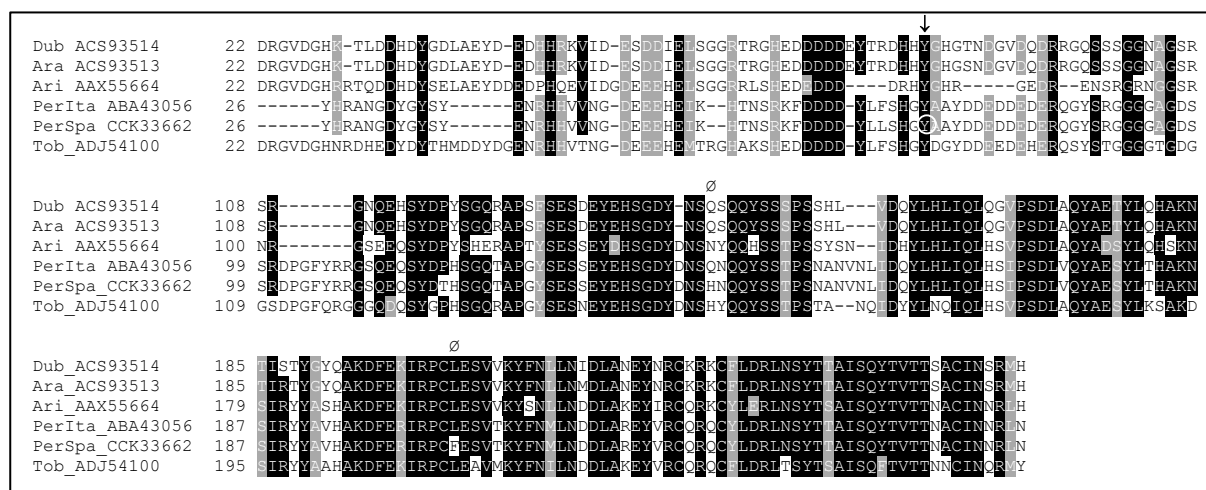
La secuencia del transcrito de la proteína amarilla SP03B (GenBank: HE974346) está altamente conservada, tanto con el gen SP03B de *P. perniciosus* de Italia (GenBank: ABA43050) como con otras secuencias de proteínas amarillas de otras especies de flebotomos (Figura 53).

PerIta_ABA43050	19	HVREEMAMKNIISYEG-----DPALNIDNIPTGFVHDAINKKIIIAIPRSPQPPITTEI
PerSpa_CCK33661	19	HVREEMAMKNIISYEG-----VDPALNIDNIPTGFVHDAINKKIIIAIPRSPQPPITTEI
Tob_ADJ54080	19	HVREEMAMKNIISYEG-----DPASNIENIPTGFVHDAINKKIIIAIPRFPQPPITTEI
Ari_AAX44093	19	HVREEMAMKNIITTEG-----DQASNIENIPTGFVHDAINKKIIIAIPRLYPQPPITTEI
Ara_ACS93501	19	HVREEMAMKNIITTEG-----DQASNIENIPTGFVHDAINKKIIIAIPRYPQPPITTEI
Arg_ABA12136	19	HVREEMAMKNIITTEG-----VNPSSNVLHSPITGFVHDAINKKIIIAIPRYPQPPITTEI
Aya_BAM69185	19	YVETGHSWSNIITTEG-----DITKDQPRNNPTAFVHDAINKKIIIAIPRLPQPPITTEI
Int_AFP99235	19	YVETGHSWSNIITTEG-----DILKSQPRNNPTAFVHDAINKKIIIAIPRLSGPPITTEI
Ser_ADJ54123	19	DVERAMAMKNIITTEG-----VKEGTQKPDITGFVHDAINKKIIIAIPRLHNPPTTEI
Pap_AGE83095	19	DVERAMAMKNIITTEG-----VKEGTQKPDITGFVHDAINKKIIIAIPRYSNPPTTEI
Dub_ABI20172	19	DVGRLEMSKNIITTEG-----VSPSVNVLHSPITGFVHDAINKKIIIAIPRYSNPPTTEI
Lon_AAS05318	19	ADTQGGKMKNIITTEG-----VTPGSNPDNMSPTAFVHDAINKKIIIAIPRLPQPPITTEI
Ang_XP_312785_2	29	EFKVEETKNIISYTN-----LPD-----RSKGSTDNETQAYNNMATHHKN-----LHITIPRIRPGPLATNVI
Dro_XP_002097461	24	DPMIEVFKWKQLDFYNGKDGMDLWSRLCIPDPHVNSRKCLGSSNSGASSTGSIQYNNVPQGVTHFR--RLFTVPRREGIPSTLN
PerIta_ABA43050	77	DTTKHP---ERSPLSKFPG-----SDKLINVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPTQNAVIAADITKENYPERIYE
PerSpa_CCK33661	77	DTTKHP---ERSPLSKFPG-----SDKLINVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPTQNAVIAADITKENYPERIYE
Tob_ADJ54080	77	DTAKHP---ERSPLSKFPG-----SDKLINVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPTQKAVIAADITKDNYPERIYE
Ari_AAX44093	77	DTTKHP---ERSPLSKFPG-----SDKLTSVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPTQNAVIAADITKENYPERIYE
Ara_ACS93501	77	DTSKHP---ERSPLSKFPG-----SDDLINVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPKKSAIAADITKKNYPERIYE
Arg_ABA12136	77	ERKKHP---ERSPLSKFSGK-----SSKDLISVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPKKQNAIAADITKENYPERIYE
Aya_BAM69185	77	NTVMHPGYVERAPKLSKFTGQ-----SSKDLISVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPKKQNAIAADITKENYPERIYE
Int_AFP99235	77	DTVKHPGYPIDRAPKLSKFTGQ-----SSKDLISVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPKKQNAIAADITKENYPERIYE
Ser_ADJ54123	77	DTTKYNR-SEVRSPSKFNSQ-----SGKEFTSVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPKKQNAIAADITKENYPERIYE
Pap_AGE83095	77	DTTKYNR-SEVRSPSKFNSQ-----SGKEFTSVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPKKQNAIAADITKENYPERIYE
Dub_ABI20172	77	STRSYNS-AERDPPKLSKFTGQ-----SSKDLISVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPKKQNAIAADITKENYPERIYE
Lon_AAS05318	77	DTKNSLGVGKHSPLKLSKFTGQ-----SGKEFTSVQPVIDCRRLWADVGRIVYKGE-QKPKKQNAIAADITKENYPERIYE
Ang_XP_312785_2	93	DMTKVSRGDRSPFOAYPSYINELQPPEDLHKLLISVATRLDQERLWFDTGMLYQGNR---MQVQRQPLWIDLRQD---LRYT
Dro_XP_002097461	113	YIDLAMDG-WNQSENLRAIPNFALN---QYNASEQNVSVYRTSVDACGRWFDVTGMLFEFNNR---QQIRRPSIWIDLANDR---LL
PerIta_ABA43050	152	IPSKAGSNTIPFGGFAVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
PerSpa_CCK33661	152	IPSKAGSHTIPFGGFAVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Tob_ADJ54080	152	IPSKAGSNPIFGGFAVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Ari_AAX44093	152	IPINAG-NQIGFGGFTVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Ara_ACS93501	152	IPKKSQ-NPLGFGGFTVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Arg_ABA12136	152	LPAEYVK-NPLSFGGFAVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Aya_BAM69185	159	LPDSVAS-KPTSFGGFAVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Int_AFP99235	159	LSDNVAT-SPTTFGGFAVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Ser_ADJ54123	157	LTGDVAQ-TPLGFGGFAVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Pap_AGE83095	157	LEGDVAR-SPLGFGGFAVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Dub_ABI20172	157	LTGNAAK-TPLGFGGFAVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Lon_AAS05318	160	FPTRVVE-KPTYEGGFAVDVINPKEGCGK---TFYITNFEINTLVYDQEKDSKISHGSKFKP-HD-TLSHDC-KQYKRVGFGGIT
Ang_XP_312785_2	178	IPASVR---EGVGMASITVDVEATDADA---AFAYIPDLVANAHVYGLRENDMSFNHSSFAHPTRAALNVA---QRFEIDDEGFSIA
Dro_XP_002097461	193	KRFEIPQSIVE---IGRGLASITVDVDARRCAD---AFAYIPDLVANAHVYGLRENDMSFNHSSFAHPTRAALNVA---QRFEIDDEGFSIA
PerIta_ABA43050	236	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
PerSpa_CCK33661	236	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Tob_ADJ54080	236	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Ari_AAX44093	235	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Ara_ACS93501	235	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Arg_ABA12136	235	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Aya_BAM69185	242	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Int_AFP99235	242	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Ser_ADJ54123	243	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Pap_AGE83095	244	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Dub_ABI20172	243	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Lon_AAS05318	243	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Ang_XP_312785_2	260	LGDRPEGN-RPYYLAGSSTKLKESKILKEKGAKEFDE-----VNLGNRGPHTEALALYDDEKTKVIFABSDRQSCWNT-KPLNH
Dro_XP_002097461	275	FSATILG-YKPDSS-RDVYFHPASTNEFVSNKVLKQECNAARSDHGGDFLLGTRGPSTQSTMHYDPRGTGVIFAEVQKSGVGCWKT
PerIta_ABA43050	318	KNTDVIASAKFTYGDISIDSESQLWFLSTGHPPLNKLKLT---FDKPHIRLRWDTAKAHR-RTRCEVVKPRKP----
PerSpa_CCK33661	318	KNTDVIASAKFTYGDISIDSESQLWFLSTGHPPLNKLKLT---FDKPHIRLRWDTAKAHR-RTRCEVVKPRKP----
Tob_ADJ54080	318	KNTDVIASAKFTYGDISIDSESQLWFLSTGHPPLNKLKLT---FDKPHIRLRWDTAKAHR-RTRCEVVKPRKP----
Ari_AAX44093	317	KNTDVIASAKFTYGDISIDSESQLWFLSTGHPPLNKLKLT---FDKPHIRLRWDTAKAHR-RTRCEVVKPRKP----
Ara_ACS93501	317	KNTDVIASAKFTYGDISIDSESQLWFLSTGHPPLNKLKLT---FDKPHIRLRWDTAKAHR-RTRCEVVKPRKP----
Arg_ABA12136	320	NHTDVIASAKFTYGDISIDSESQLWFLSTGHPPLNKLKLT---FDKPHIRLRWDTAKAHR-RTRCEVVKPRKP----
Aya_BAM69185	324	ENTDVIASAKFTYGDISIDSESQLWFLSTGHPPLNKLKLT---FDKPHIRLRWDTAKAHR-RTRCEVVKPRKP----
Int_AFP99235	325	ENTDVIASAKFTYGDISIDSESQLWFLSTGHPPLNKLKLT---FDKPHIRLRWDTAKAHR-RTRCEVVKPRKP----
Ser_ADJ54123	324	ENTDVIASAKFTYGDISIDSESQLWFLSTGHPPLNKLKLT---FDKPHIRLRWDTAKAHR-RTRCEVVKPRKP----
Pap_AGE83095	326	KNVGVINTNAYFVFGDIDMDADSTLWFMNGGPPPTLPLKDFD---KQIRLRYVPTTHRAIR-NLPEVVRKPK----
Dub_ABI20172	326	KNVGVINTNAYFVFGDIDMDADSTLWFMNGGPPPTLPLKDFD---KQIRLRYVPTTHRAIR-NLPEVVRKPK----
Lon_AAS05318	326	KNVGVINTNAYFVFGDIDMDADSTLWFMNGGPPPTLPLKDFD---KQIRLRYVPTTHRAIR-NLPEVVRKPK----
Ang_XP_312785_2	350	NHAVVHLDNRELTPSDITSDGVLWFLNNGGPPPTLPLKDFD---KQIRLRYVPTTHRAIR-NLPEVVRKPK----
Dro_XP_002097461	364	SKPFSTENHGSVYSNSEMYPDLTIDEEGYIWWNSMSPFVYKSLDVQ---KYNFRWIRQATSLAKR-GTVCE---

Figura 53. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas codificantes de proteínas amarillas: *L. longipalpis* (Lon), *L. intermedia* (Int), *L. ayacuchensis* (Aya), *P. arabicus* (Ara), *P. ariasi* (Ari), *P. perniciosus* de Italia (PerIta), *P. perniciosus* de España (PerSpa), *P. tobbi* (Tob), *P. argentipes* (Arg), *P. duboscqi* (Dub), *P. papatasi* (Pap), *P. sergenti* (Ser), *An. gambiae* (Ang) y *D. melanogaster* (Dro). (Ø): Cambios en la predicción de la estructura secundaria entre PerSpa y PerIta. (↓): Cambios en la predicción de los sitios de fosforilación, el

aminoácido afectado aparece rodeado por un círculo. (♣): Aminoácidos implicados en el sitio de unión a ligando.

Las proteínas relacionadas con ParSP25 presentan residuos ácidos conservados en su secuencia. Concretamente, la proteína SP08 aislada de nuestra genoteca se encuentra altamente conservada con la secuencia de SP08 de flebotomos de Italia (Figura 54).



**Figura 54.** Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas codificantes de proteínas relacionadas con ParSP25: *P. arabicus* (Ara), *P. ariasi* (Ari), *P. perniciosus* de Italia (PerIta), *P. perniciosus* de España (PerSpa), *P. tobbi* (Tob), *P. duboscqi* (Dub). (Ø): Cambios en la predicción de la estructura secundaria entre PerSpa y PerIta. (↓): Cambios en la predicción de los sitios de fosforilación, el aminoácido afectado aparece rodeado por un círculo.

La secuencia aminoacídica codificada por el transcrito SP06 (GenBank: CCK18035), aislado de la genoteca, comparte un 44% de identidad con la secuencia de lufaxina de *L. longipalpis* (GenBank: AAS05319), tal y como se muestra en la Figura 55.

PerSpa_CCK18305	23	IKVIRFDDRDLVLLGKPDNTDEELLYSTDFIKNTCANPK--MKCTNNATHFVLDFSDPKKRCISSIHVFSTPDGPNLEENKFKQSKSS
PerIta_ABA43054	23	IKVIRFDDRDEYLLGKPDNTDEELLYSTDFIKNTCANPK--MKCTNNATHFVLDFSDPKKRCISSIHVFSTPDGPNLEENKFKRPSKSS
Lon_AAS05319	24	-----LGDEYFGRKYKERDETLFQASGLKIDPQIVLGYKCSNNOHFLVLEKTNKKSQISATKTSYE--KLNQ---NSDLKKN-
PerSpa_CCK18305	112	IYQVGGIGQSYCLLVFKKKERREDALVDIRGL--KTCSLKERYTSGDPKKTDAYGMAYKFDKNDNWSIKREGVKQWKRSGNEIFYRKN
PerIta_ABA43054	112	IYQVGGIGQSYCLLVFKKKERREDALVDIRGL--KTCSLKERYTSGDPKKTDAYGMAYKFDKNDNWSIKREGVKQWKRSGNEIFYRKN
Lon_AAS05319	102	IYCTGGIGTDNCRLLVFKKKERQIAANLIIYGPAPKCCSEKRYIGDELHVLDSYGLPQCFDOEHGWNVERYNFKDTRFSTEIFYHKN
PerSpa_CCK18305	194	GLMNHQIRYLSKFDKYTVTREMVVKRAKKFTMDFSNGQYRISFLDVYWFQESVKHKPKLPYIYNGECLPSNKTCLFDADDEPITY
PerIta_ABA43054	194	GLMNHQIRYLSKFDKYTVTREMVVKRAKKFTMDFSNGQYRISFLDVYWFQESVKHKPKLPYIYNGECLPSNKTCLVDFADDEPITY
Lon_AAS05319	185	GLFNQIIVYLAEEFSSEARETAKDIKKKFSILPNEEYKRISFLDVYWFQETMRKKPKYPYIHYNGECSNENKTCLVFDTDDELITY
PerSpa_CCK18305	276	AFVKVFSNPDHNEPRLRHADLGRG
PerIta_ABA43054	276	AFVKVFSNPDHNEPRLRHADLGRG
Lon_AAS05319	267	ALVKVFNP SDGSRL EEDLGRG

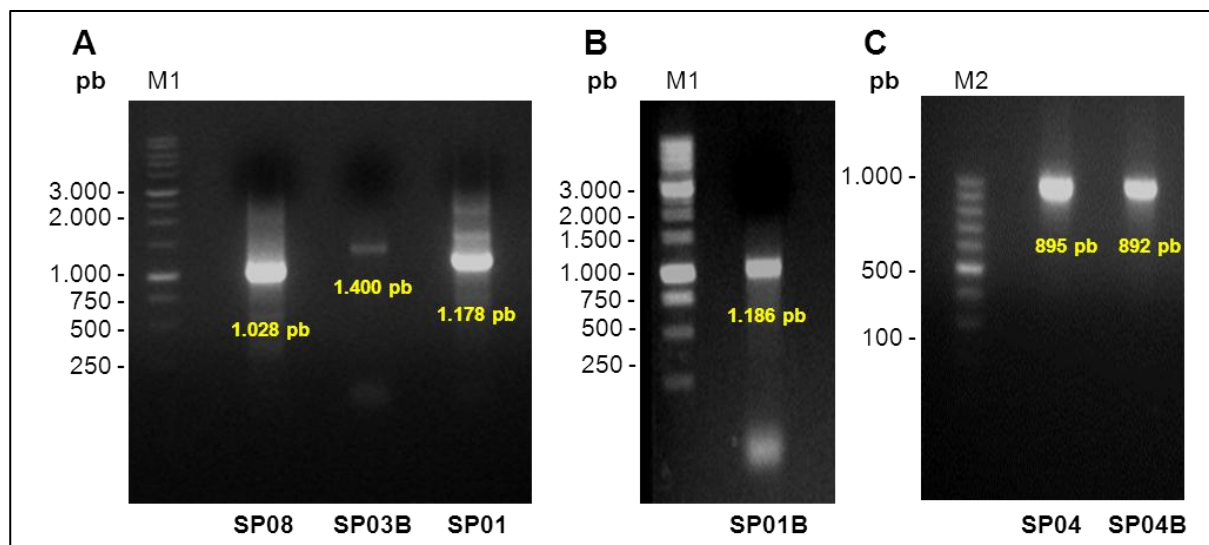
**Figura 55. Alineamiento de SP06 de *P. perniciosus* de España (PerSpa), Italia (PerIta) y lufaxina de *L. longipalpis* (Lon). (Ø) Cambios en la predicción de la estructura secundaria entre PerSpa y PerIta. (↓): Cambios en la predicción de los sitios de fosforilación, el aminoácido afectado aparece rodeado por un círculo.**

El transcrito que codifica la proteína hipotética P119 (GenBank: HE985078) se aisló de la genoteca de cDNA de *P. perniciosus* de España. Esta proteína comparte homología con varias proteínas hipotéticas de diferentes insectos, siendo del 81% con *Ae. aegypti* (GenBank: XM\_001663068; Tabla 33).

## 4.7 Obtención de proteínas recombinantes

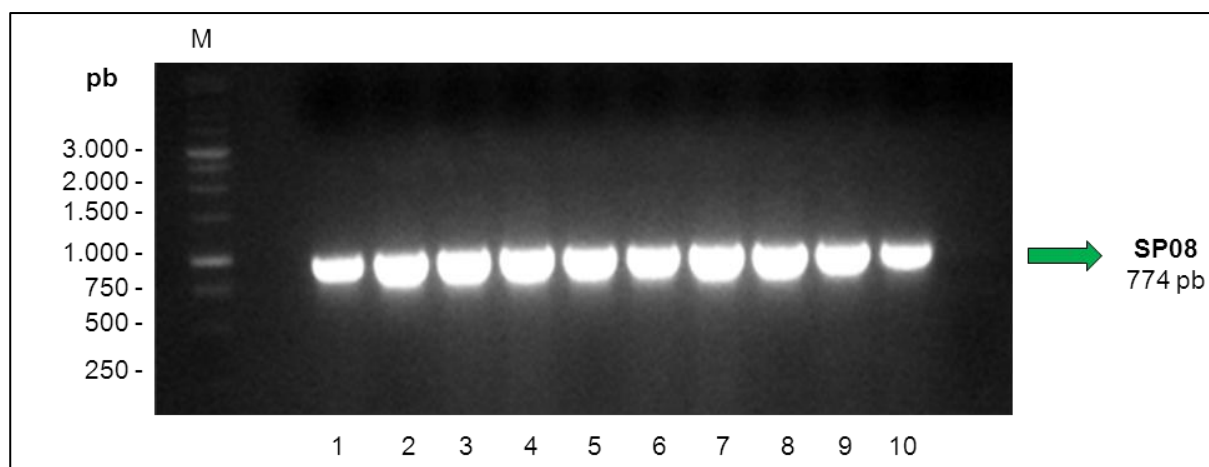
### 4.7.1 Clonación de genes que codifican las proteínas de la saliva SP01, SP01B, SP03B, SP04, SP04B y SP08.

La **amplificación** inicial de los genes se realizó mediante PCR, bien a partir de los plásmidos pTriplEx2 que contenían los insertos (SP01B, SP04 y SP04B) o empleando la genoteca amplificada diluida como ADN molde (SP01, SP03B, SP08), siguiendo la metodología descrita en los Apartados 3.2.7.12.1 y 3.2.7.12.2, respectivamente. El análisis de los productos amplificados en geles de agarosa reveló la existencia de bandas correspondientes a los tamaños esperados para cada gen. Fueron de 1.178 pb para SP01, 1.186 pb para SP01B, 1.400 pb para SP03B, 895 pb para SP04, 892 pb para SP04B y 1.028 pb para SP08 (Figura 56A, B y C). Estos tamaños se corresponden con el tamaño del CDS, más la región no codificante del plásmido pTriplEx2 situada entre los cebadores empleados.



**Figura 56. Amplificación de los genes que codifican las proteínas salivales. A) Genes SP08, SP03B y SP01. B) SP01B. C) SP04 y SP04B. M1 y M2: Marcadores de peso molecular de 1 Kb y 100 pb, respectivamente (Biotools®).**

Tras la subclonación en el vector pCR®4-TOPO® (según lo especificado en el Apartado 3.2.7.13.1), los clones recombinantes se comprobaron por PCR (Apartado 3.2.7.8). Se seleccionó un clon de cada gen para continuar los trabajos de subclonación. En la Figura 57 se muestra la electroforesis de la PCR de clones recombinantes de SP08 en el vector pCR®4-TOPO®.

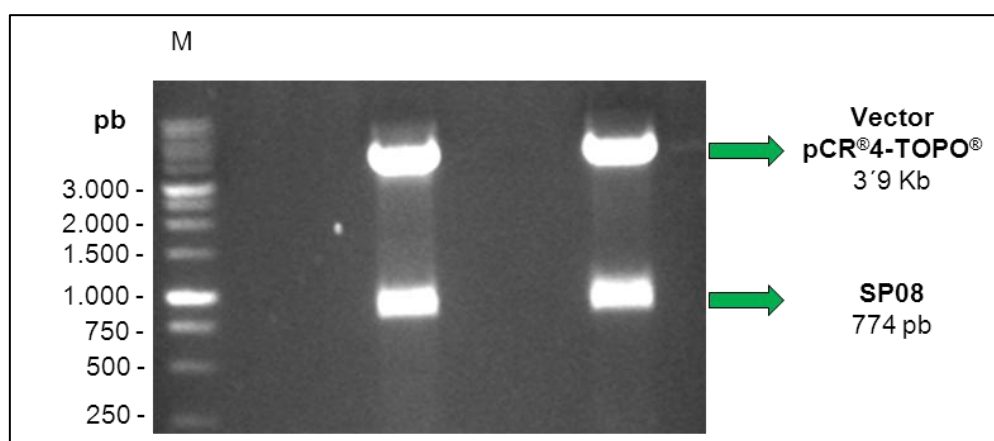


**Figura 57. Análisis de los clones recombinantes de SP08 en el vector pCR®4-TOPO®, mediante PCR. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Biotools®).**

Una vez comprobada la identidad de los clones mediante secuenciación, se amplificaron nuevamente los genes con cebadores que contenían los sitios de restricción adecuados. De la misma forma, se obtuvieron amplicones de los tamaños esperados que fueron clonados nuevamente en el vector pCR®4-TOPO®.

Con el fin de comprobar que la polimerasa no había introducido mutaciones, se realizó la secuenciación completa de ambas hebras de ADN de los plásmidos recombinantes pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> que contenían los genes con los sitios de restricción. Las secuencias obtenidas fueron idénticas a las previamente secuenciadas para cada gen y se confirmó la presencia de los sitios de restricción introducidos.

Para la **subclonación dirigida en los vectores de expresión** (pQE31 y pGEX4T3), los genes codificantes se aislaron por digestión enzimática de los plásmidos recombinantes pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> conteniendo los sitios de restricción (Figura 58). Tras la purificación de los fragmentos de ADN digeridos y subclonación en los vectores de expresión (Apartado 4.7.1) se comprobaron por PCR los clones recombinantes, permitiendo seleccionar un clon de cada una de las moléculas del estudio. La correcta orientación del inserto en los vectores recombinantes pQE31 y pGEX4T3 se confirmó mediante secuenciación, a partir del plásmido aislado, y se transformó en las células bacterianas adecuadas para la posterior expresión proteica (*E. coli* M15, BL21 y *ArcticExpress*).



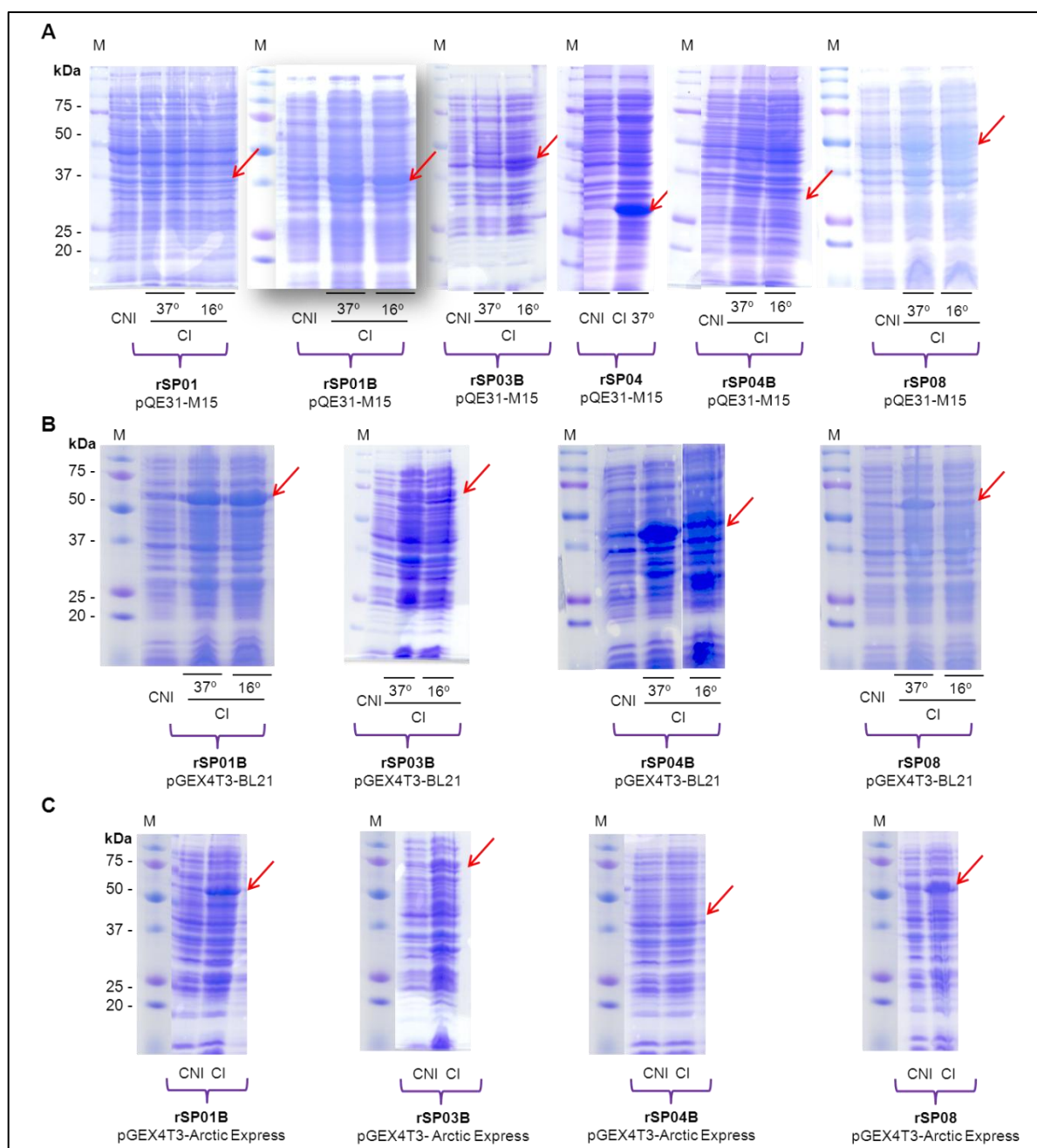
**Figura 58. Digestión con enzimas de restricción (*Bam*HI/*Sal*I) de SP08 en los plásmidos recombinantes pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>. La banda superior corresponde al vector linealizado (3.9 Kb) y la inferior a SP08. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Biotools<sup>®</sup>).**

#### **4.7.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes de la saliva de *P. perniciosus*.**

Para la optimización de la **expresión de las proteínas** se ensayaron concentraciones de IPTG de 0'01 mM y 1 mM y diferentes temperaturas con distintos tiempos de inducción (37°C, 3 h; 16°C, 16 h o 4°C, 24 h), según la proteína y la estirpe bacteriana empleada. El éxito de la expresión de las proteínas recombinantes varió considerablemente según la proteína.

Usando el sistema pQE31-*E. coli* M15, se expresaron satisfactoriamente la apirasa rSP01B y rSP04 a las temperaturas testadas, sin embargo, la expresión de rSP03B y rSP08 únicamente se hizo patente a 16°C o 37°C, respectivamente. rSP01 y rSP04B no se pudieron expresar satisfactoriamente en este sistema.

Con el sistema pGEX4T3-*E. coli* BL21, se expresó la proteína rSP01B a ambas temperaturas (37 y 16°C). rSP04B y rSP08 únicamente se expresaron a 37°C, mientras que rSP03B sólo mostró leves niveles de expresión a 16°C. La expresión de las proteínas rSP01 y rSP04 no se realizó con los sistemas pGEX4T3-*E. coli* BL21 ni pGEX4T-*E. coli ArcticExpress*. Las proteínas rSP01B y rSP08 se expresaron abundantemente en sistema pGEX4T3- *E. coli ArcticExpress*. Algunas de las pruebas realizadas para la optimización de las condiciones de expresión se exponen en la Figura 59.



**Figura 59. Expresión de las proteínas recombinantes. A)** Expresión de las células M15 que contenían el plásmido recombinante pQE31, a 37°C durante 3 h o a 16°C durante 16 h. **B)** Expresión de las células BL21 que contenían el plásmido recombinante pGEX4T3, a 37°C durante 3 h o a 16°C durante 16 h. **C)** Expresión de las células *ArcticExpress* que contenían el plásmido recombinante pGEX4T3, a 4°C durante 24 h. CNI: 20  $\mu$ l de cultivo bacteriano no inducido. CI: 20  $\mu$ l de cultivo inducido en presencia de 1 mM de IPTG. M: Marcador de peso molecular *Precision Plus Dual Xtra* (Bio-Rad®).

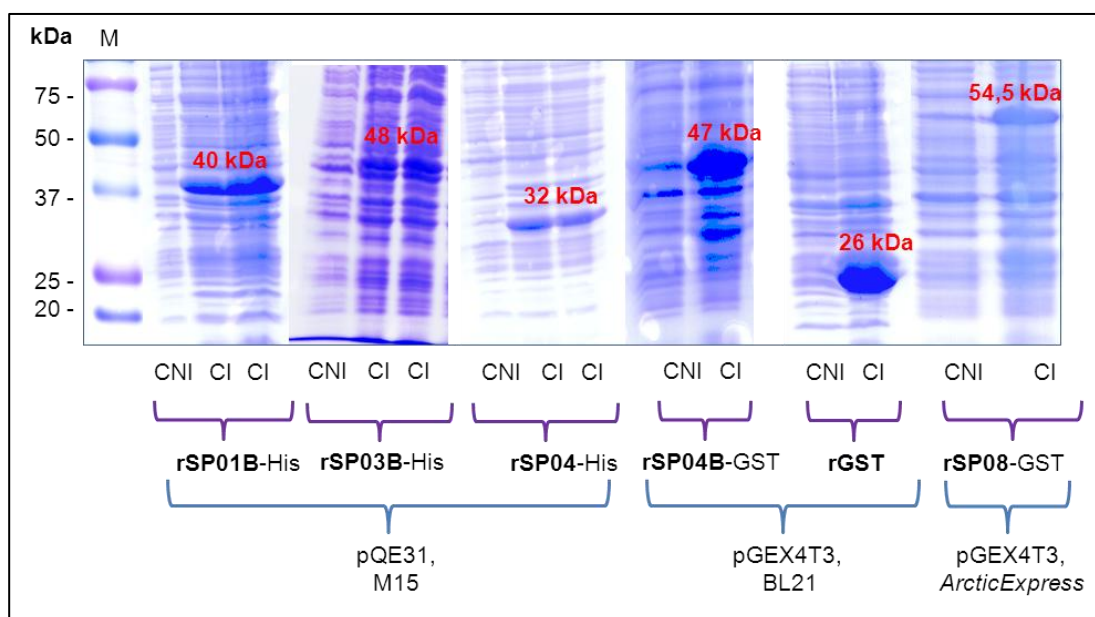


Las condiciones de trabajo idóneas para la expresión de cada proteína se recogen en la Tabla 35.

**Tabla 35. Condiciones óptimas para la expresión de las proteínas salivales de *P. perniciosus*.**

	Vector	Cepa <i>E. coli</i>	Temperatura y tiempo de inducción	IPTG
<b>rSP01B</b>	pQE31	M15	37°C, 3 h	1 mM
<b>rSP03B</b>	pQE31	M15	16°C, 16 h	1 mM
<b>rSP04</b>	pQE31	M15	37°C, 3 h	1 mM
<b>rSP04B</b>	pGEX4T3	BL21	37°C, 3 h	1 mM
<b>rSP08</b>	pGEX4T3	<i>ArcticExpress</i>	4°C, 24 h	1 mM
<b>rGST</b>	pGEX4T3	BL21	37°C, 3 h	1 mM

Se analizaron en cada caso los extractos crudos de cultivos bacterianos, inducidos y no inducidos. En la Figura 60 se muestran los resultados de la expresión de las proteínas recombinantes rSP01B, rSP03B, rSP04, rSP04B, rSP08 y rGST en las condiciones previamente descritas.



**Figura 60. Expresión de las proteínas recombinantes rSP01B (37 kDa), rSP03B (45 kDa), rSP04 (29 kDa), rSP04B (21 kDa), rGST (26 kDa) y rSP08 (28,5 kDa). CNI: 20 µl de cultivo bacteriano no inducido. CI: 20 µl de cultivo inducido. M: Marcador de peso molecular *Precision Plus Dual Xtra* (Bio-Rad®).**

La **purificación de las proteínas** de fusión se llevó a cabo siguiendo diferentes protocolos, según el sistema de expresión empleado. Para las proteínas expresadas en el vector pQE31 la purificación se realizó en condiciones desnaturalizantes, mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados. rSP01B y rSP04 pudieron purificarse satisfactoriamente siguiendo este protocolo. La inmunodetección de los residuos de histidina en las proteínas recombinantes, mediante *WB*, permitió comprobar la identidad de las proteínas purificadas. En la Figura 61 se muestra la presencia de las proteínas recombinantes rSP01B y rSP04 en los diferentes eluidos de la columna de níquel, durante el proceso de purificación, y los resultados de *WB* con anticuerpos que reconocen específicamente las proteínas de fusión a histidina. Sin embargo, la proteína rSP03B no pudo purificarse de acuerdo con estas condiciones.

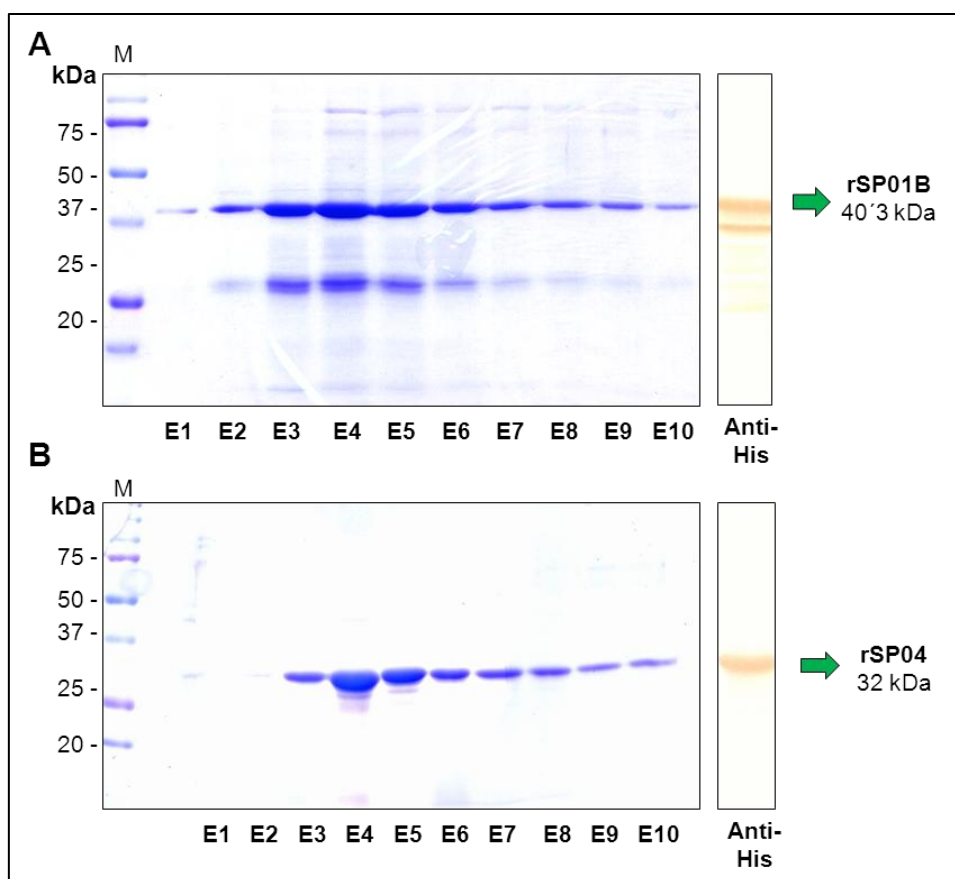
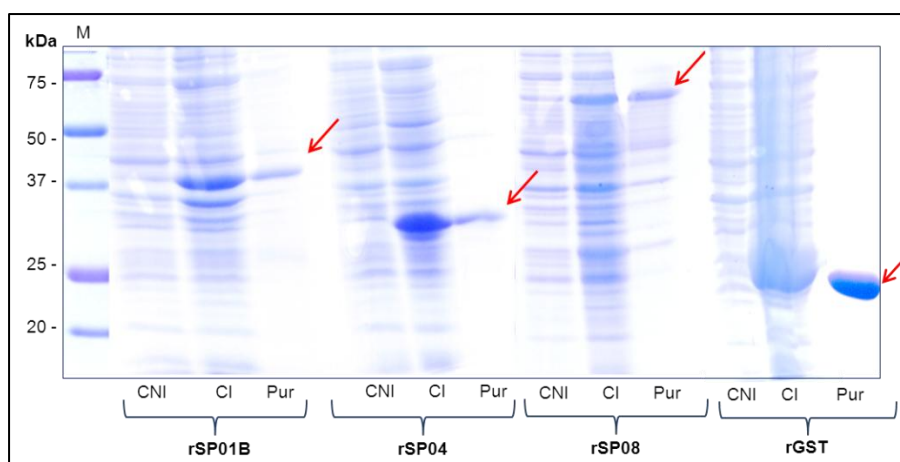


Figura 61. Eluidos E1 a E10 de las proteínas recombinantes e inmunodetección de los residuos de histidina. A) rSP01B. B) rSP04. M: Marcador de peso molecular *Precision Plus Dual Xtra* (Bio-Rad®).

En el caso de rSP04B y rSP08, no se consiguieron niveles de expresión adecuados utilizando el sistema de expresión en pQE-*E. coli* M15, por lo se partió, respectivamente, de los clones recombinantes BL21 y *ArcticExpress* para la purificación. En paralelo a estos experimentos se purificó la rGST, partiendo de células BL21 transformadas con el vector vacío pGEX4T3 e inducidas con IPTG 1 mM a 37°C durante 3 h, y se utilizó como control de las proteínas salivales fusionadas a rGST en posteriores ensayos. Para la purificación de rSP04B, rSP08 y rGST en pGEX se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (Amersham®), aunque tan sólo se obtuvieron niveles aceptables de proteína purificada para la rGST. Con el fin de mejorar estos resultados, se incorporaron algunas variaciones en el protocolo, como los lavados y la elución en presencia de Tritón X-100 (0'1%), el incremento del número de pulsos en la sonicación, adición de lisozima en la lisis (200 µg/ml) y el incremento de la concentración de glutatona reducida en la solución de elución de 10 a 15 mM. Desafortunadamente, estos cambios no mejoraron el rendimiento de la técnica, por lo que rSP04B no pudo ser purificada. En el caso de rSP08, se procedió a su elución del gel de poliacrilamida en PBS (Apartado 3.2.8.2.2). En la Figura 62 se muestran los resultados del proceso de purificación de las proteínas recombinantes rSP01B, rSP04, rSP08 y rGST.



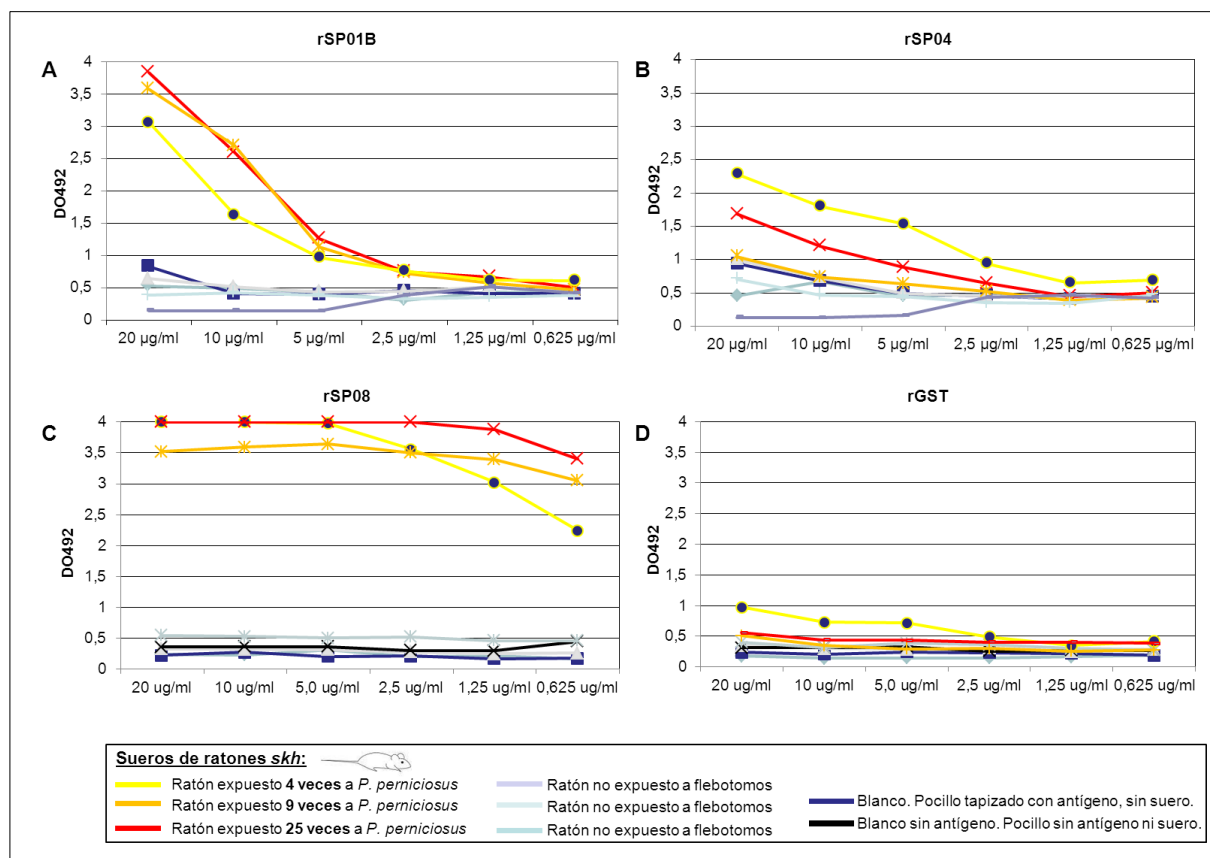
**Figura 62. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes (rSP01B, rSP04, rSP08 y rGST). CNI: 20 µl de cultivo bacteriano no inducido. CI: 20 µl de cultivo inducido. Pur: 20 µl de proteína purificada. Las flechas rojas indican la proteína purificada. M: Marcador de peso molecular *Precision Plus Dual Xtra* (Bio-Rad®).**

Las proteínas recombinantes rSP01B, rSP04 y rGST se dializaron frente a PBS para eliminar la urea y favorecer la renaturalización de rSP01B y rSP04, y frente a glutatona reducida, en el caso de rGST. Las muestras se concentraron y finalmente se liofilizaron para inhibir la degradación proteica.

#### **4.8 Evaluación de las proteínas recombinantes como marcadores de exposición a las picaduras de *P. perniciosus***

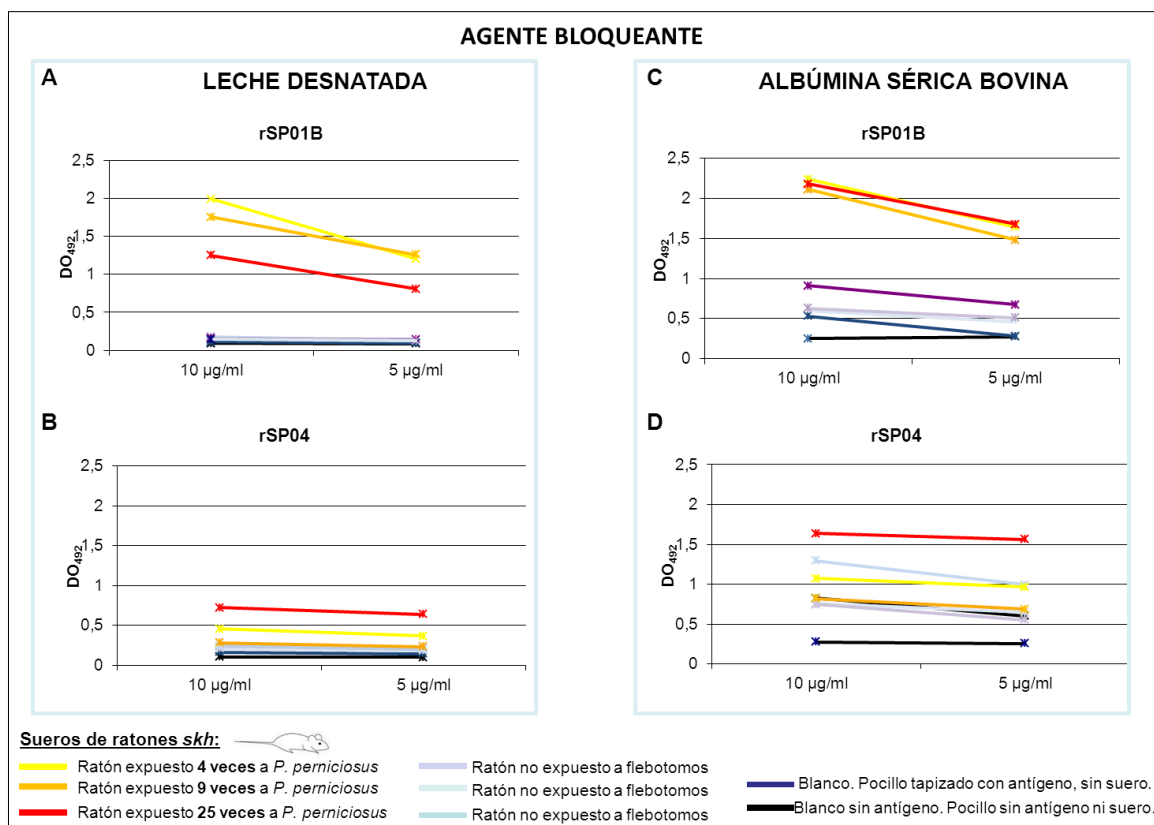
Las proteínas recombinantes rSP01B, rSP04 y rSP08 fueron evaluadas mediante las técnicas de ELISA y WB como candidatas a marcadores de la exposición a la picadura de *P. perniciosus*, utilizando sueros de ratones y perros experimentalmente expuestos (Apartado 3.2.9). Inicialmente, se optimizaron condiciones de la técnica de ELISA tales como la cantidad de antígeno utilizada, el pH de la solución de tapizado y la composición de la solución de bloqueo. Debido a que rSP08 está en forma de proteína fusionada a rGST, siempre se trabajó en paralelo con rGST recombinante como control, para poder afirmar que los resultados obtenidos se debieron a las propiedades inmunogénicas de la proteína rSP08.

Para valorar la cantidad de antígeno necesaria se tapizaron las placas con diluciones seriadas de proteína (20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2´5 µg/ml, 1´25 µg/ml y 0´625 µg/ml) y se estudió la respuesta de anticuerpos IgG en **sueros de ratones *skh*** control (n=3) y en sueros de ratones inmunizados frente a la saliva de *P. perniciosus* (n=3). El nivel de anticuerpos antisaliva presentes en los sueros de ratones inmunizados disminuye de acuerdo a la cantidad de proteína empleada en el tapizado de las placas. A concentraciones muy elevadas de antígeno (20 µg/ml) se observó también una elevación de los niveles de anticuerpos en los sueros de animales control. Por estos motivos se seleccionaron las concentraciones de antígeno que permitían una mejor discriminación entre sueros de animales inmunizados y no inmunizados: 10 µg/ml para rSP01B, 1´25 µg/ml para rSP08 y su control rGST, que no dio lugar a una respuesta inmune detectable en ratones. A pesar de que rSP04 no mostró buenos resultados de discriminación entre sueros de ratones *skh* expuestos y no expuestos, se seleccionó la concentración de 10 µg/ml para posteriores experimentos (Figura 63A, B, C y D).



**Figura 63. Niveles de anticuerpos IgG presentes en sueros de ratones *skh* en función de la concentración de proteína recombinante utilizada para tapizar las placas de ELISA. A) Placas tapizadas con rSP01B; B) Placas tapizadas con rSP04; C) Placas tapizadas con rSP08; D) Placas tapizadas con rGST.**

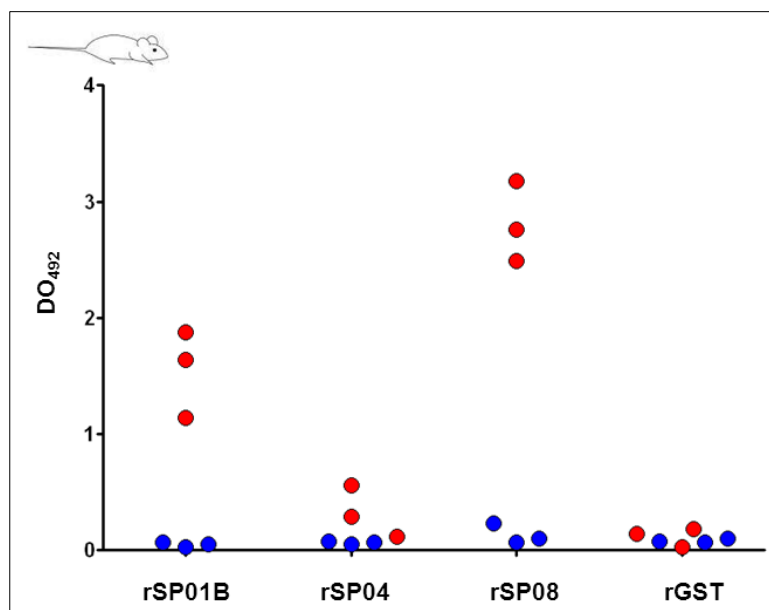
Análogamente, se analizó la influencia que ejerce el pH de la solución de tapizado, estableciéndose que el valor óptimo para tapizar las placas era 9'5, ya que la señal de los sueros de animales inmunizados disminuía a pH más elevados. Se evaluaron diversas condiciones de bloqueo con dos concentraciones de proteínas recombinantes, rSP01B y rSP04 (10 y 5 µg/ml). Se seleccionó leche desnatada al 6% (Bio-Rad®) como agente bloqueante en lugar de BSA al 6% (Sigma®), por su mayor eficacia de bloqueo (Figura 64).



**Figura 64. Niveles de anticuerpos IgG frente a las proteínas recombinantes rSP01B y rSP04, presentes en sueros de ratones *skh*, en función del agente bloqueante. A) Leche desnatada. B) BSA.**

Las condiciones con las que obtuvieron los resultados más óptimos fueron las siguientes: para el tapizado de las proteínas recombinantes, 10 µg/ml de rSP01B y rSP04 y 1'25 µg/ml de rSP08 y rGST, a pH 9'5 y posterior bloqueo de las placas con 6% de leche desnatada.

En la Figura 65 se muestran los resultados de la evaluación de estas tres proteínas de la saliva como marcadores de la exposición a la picadura de *P. perniciosus* utilizando sueros de ratones *skh*. Las proteínas recombinantes rSP01B y rSP08 son capaces de discriminar con claridad entre ratones expuestos y no expuestos a los flebotomos, a diferencia de la rSP04. No se detectaron anticuerpos frente a la proteína rGST en ninguno de los sueros de los ratones estudiados.



**Figura 65. Evaluación de las proteínas recombinantes rSP01B, rSP04, rSP08 y rGST como marcadores de la exposición a la picadura de *P. perniciosus* con sueros de ratones *skh*. (●) Sueros de ratones no expuestos a los flebotomos. (●): Sueros de ratones expuestos a los flebotomos.**

En el caso de rSP01B y rSP08, los niveles de anticuerpos frente a estas proteínas recombinantes se correlacionaron positivamente con los niveles totales de anticuerpos antisaliva (rSP01B:  $r=0.94$ ,  $p=0.017$  y rSP08:  $r=1.0$ ,  $p=0.003$ ), no siendo así para rSP04 ( $p>0.05$ ).

Aplicando las condiciones óptimas estandarizadas previamente para la técnica de ELISA, se estudió la especificidad de las proteínas recombinantes utilizando sueros de ratones inmunizados frente a la saliva de *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *L. longipalpis* (Apartado 3.2.12). El reconocimiento de la proteína rSP01B fue específico por parte de los sueros de ratones inmunizados frente a la saliva de *P. perniciosus*. Sin embargo, la proteína rSP04 fue reconocida por los sueros de animales inmunizados con la saliva de *P. perniciosus* con la misma intensidad que los sueros de animales inmunizados a través de la picadura de *P. papatasi* y *L. longipalpis*. Los sueros de ratones inmunizados con la saliva de *P. sergenti* reconocieron la proteína rSP04 con mayor intensidad que los sueros de los ratones expuestos a *P. perniciosus*. Al proceder de forma similar con las proteínas rSP08 y rGST, pudimos observar una notable reactividad cruzada entre los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con la saliva de *P. perniciosus* y de *P. sergenti*. Sin embargo, no se observó reconocimiento de la rSP08 cuando se utilizaron los sueros de animales inmunizados con la saliva de *P. papatasi* y *L. longipalpis*. Ningún suero

reconoció la proteína control rGST, validándose los datos de reconocimiento de rSP08 (Figura 66).

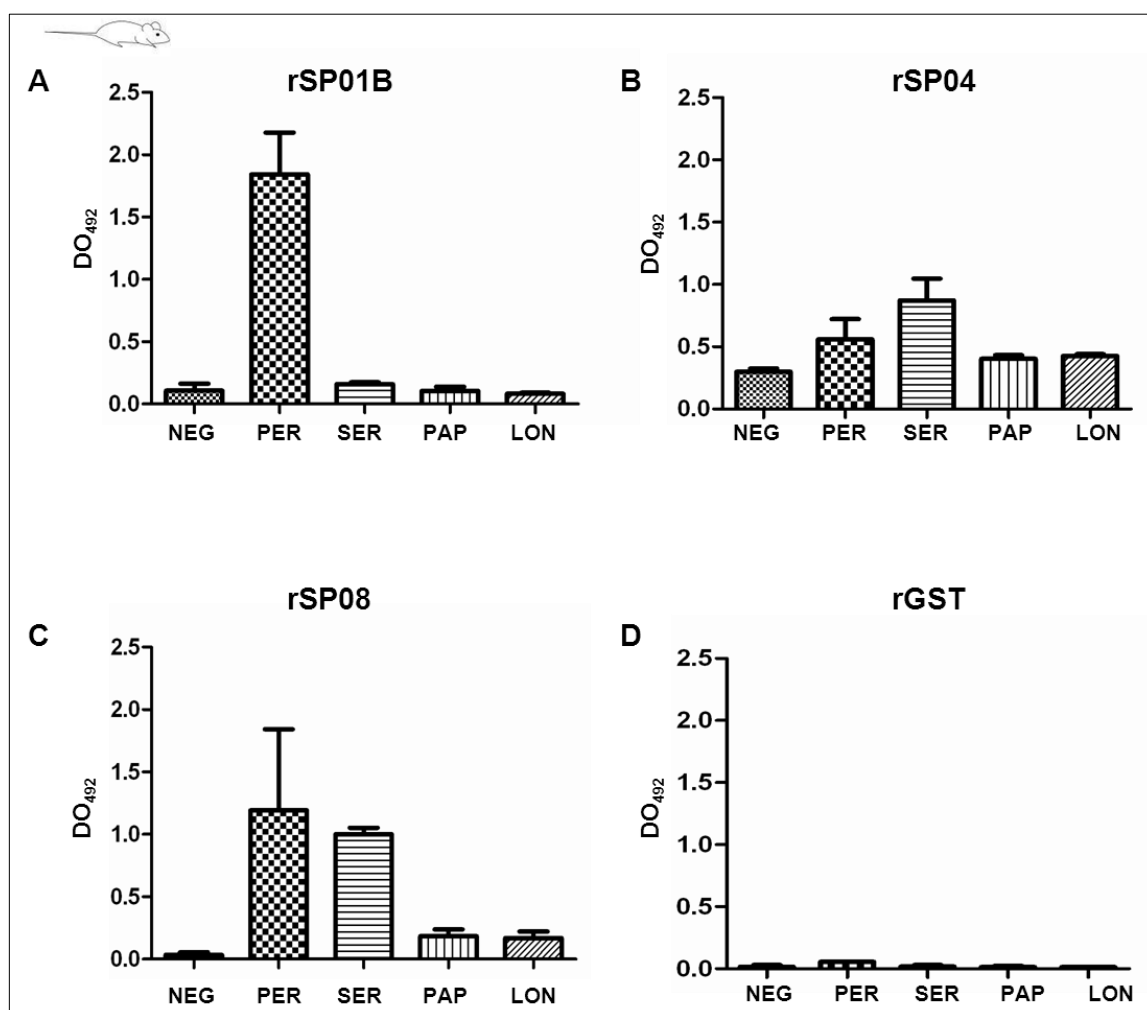
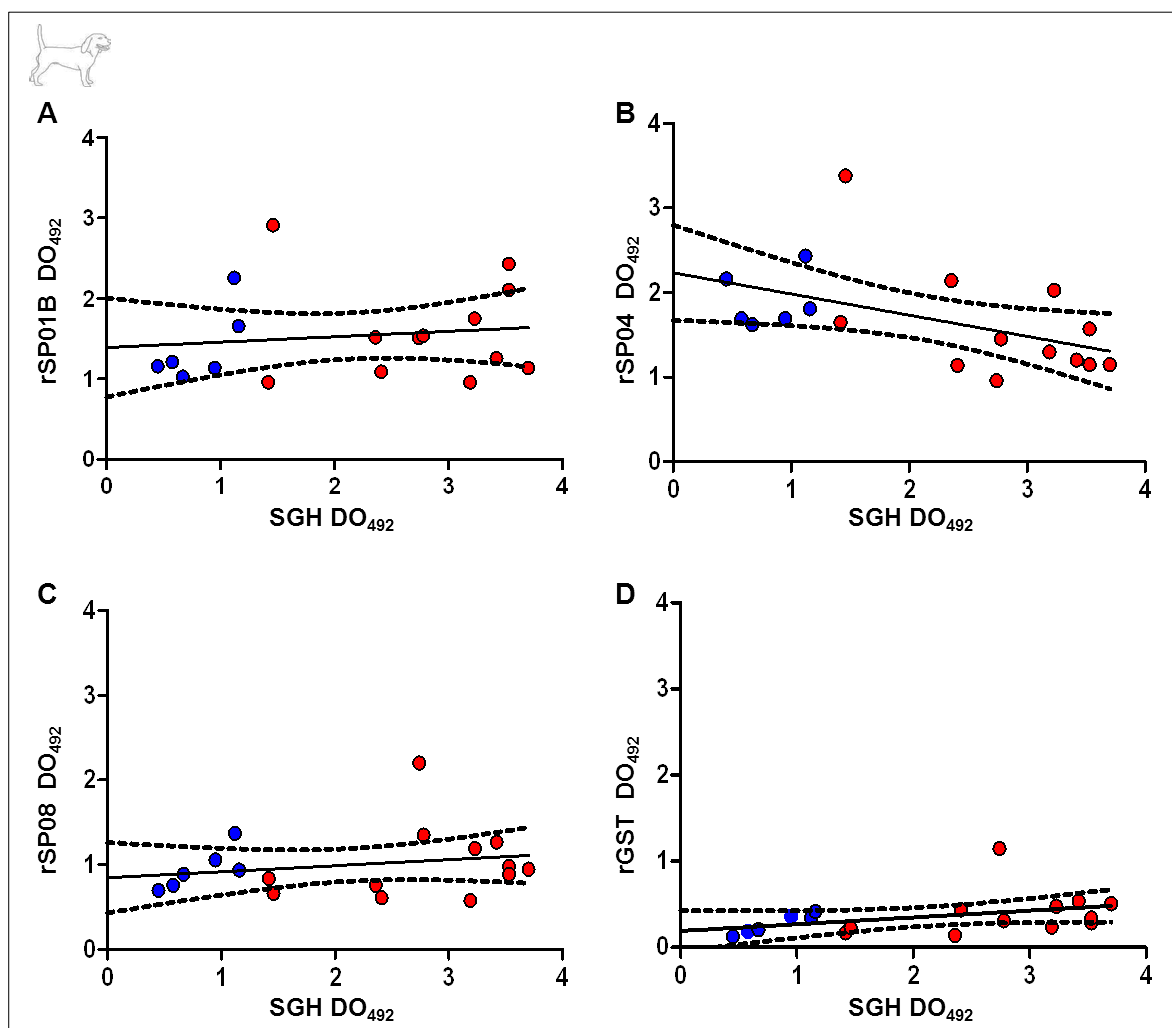


Figura 66. Especificidad de las proteínas recombinantes de la saliva de *P. perniciosus*. Niveles de anticuerpos IgG presentes en los sueros de ratones *skh* no inmunizados (NEG) o inmunizados con la saliva de *P. perniciosus* (PER), *P. sergenti* (SER), *P. papatasi* (PAP) y *L. longipalpis* (LON). A) rSP01B. B) rSP04. C) rSP08 y D) rGST. El nivel de anticuerpos está expresado como la media de la densidad óptica de dos sueros hiperinmunes de ratón.

Una vez estandarizadas las condiciones con los sueros de ratones, se procedió a evaluar las proteínas con los **sueros de perro**. Para ello se comparó la respuesta de tipo IgG de los sueros de 18 perros (Apartado 3.2.9.1) frente a las proteínas recombinantes y al extracto salival total de *P. perniciosus*. Ninguna de las tres proteínas recombinantes estudiadas mostró resultados satisfactorios como marcadores de exposición a la picadura usando sueros de perro. rSP01B, rSP04 y rSP08 no discriminaron entre perros expuestos a la picadura y perros control. Tampoco se observó una correlación estadísticamente significativa entre el incremento del nivel de anticuerpos IgG frente al extracto proteico de la saliva y frente a las proteínas recombinantes, como se puede observar en la Figura 67



(A: rSP01B versus SGH,  $r=0.21$ ,  $p=0.353$ ; B: rSP04 versus SGH,  $r=-0.59$ ,  $p=0.011$ ; C: rSP08 versus SGH,  $r=0.24$ ,  $p=0.339$  y D: rGST versus SGH,  $r=0.15$ ,  $p=0.109$ ).



**Figura 67. Evaluación de las proteínas recombinantes como marcadores de exposición en perros. Correlación entre los niveles IgG antisaliva (SGH) y las proteínas recombinantes rSP01B (A). rSP04 (B); rSP08 (C) y rGST (D). (●): Sueros de perros expuestos a los flebotomos. (●): Sueros de perros no expuestos a los flebotomos.**

En cuanto a los ensayos de *WB* con las proteínas recombinantes y los sueros de ratones, existe concordancia con los resultados mediante ELISA. Los tres sueros de ratones hiperinmunes reconocieron las proteínas rSP01B y rSP08 específicamente. No fue así en el caso de la rSP04 (Figura 68).

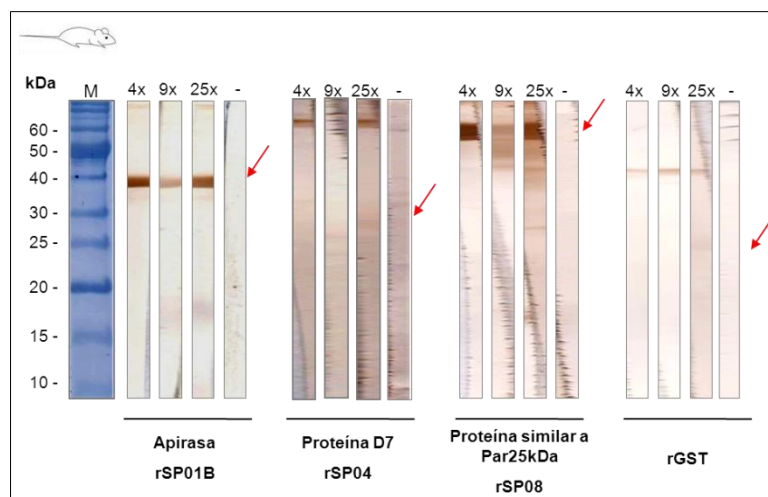


Figura 68. Reconocimiento de las proteínas recombinantes de la saliva de *P. perniciosus* por los sueros de ratón, mediante WB. rSP01B: 1 µg/pocillo; rSP04: 2 µg/pocillo; rSP08: 2 µg/pocillo; rGST: 1 µg/pocillo. El área de la membrana de PVDF correspondiente a cada pocillo se cortó en 4 partes que se incubaron con los distintos sueros de ratones *skh* expuestos 4, 9 y 25 veces a las picaduras de *P. perniciosus*. (-): Control negativo (suero de un ratón no expuesto). M: Marcador de peso molecular *BenchMark* (Invitrogen®).

Los sueros de los 3 perros hiperinmunes seleccionados reconocieron específicamente las proteínas rSP01B y rSP08, pero no la rSP04 (Figura 69), datos no concordantes con los resultados previos mediante ELISA (Figura 67).

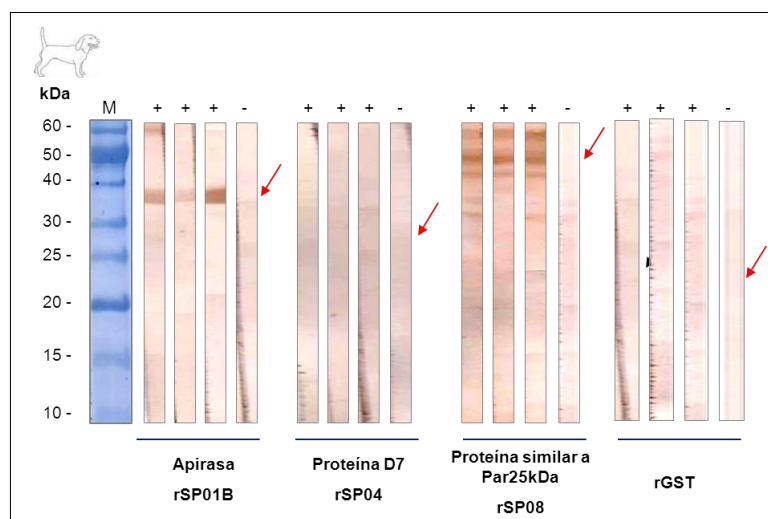
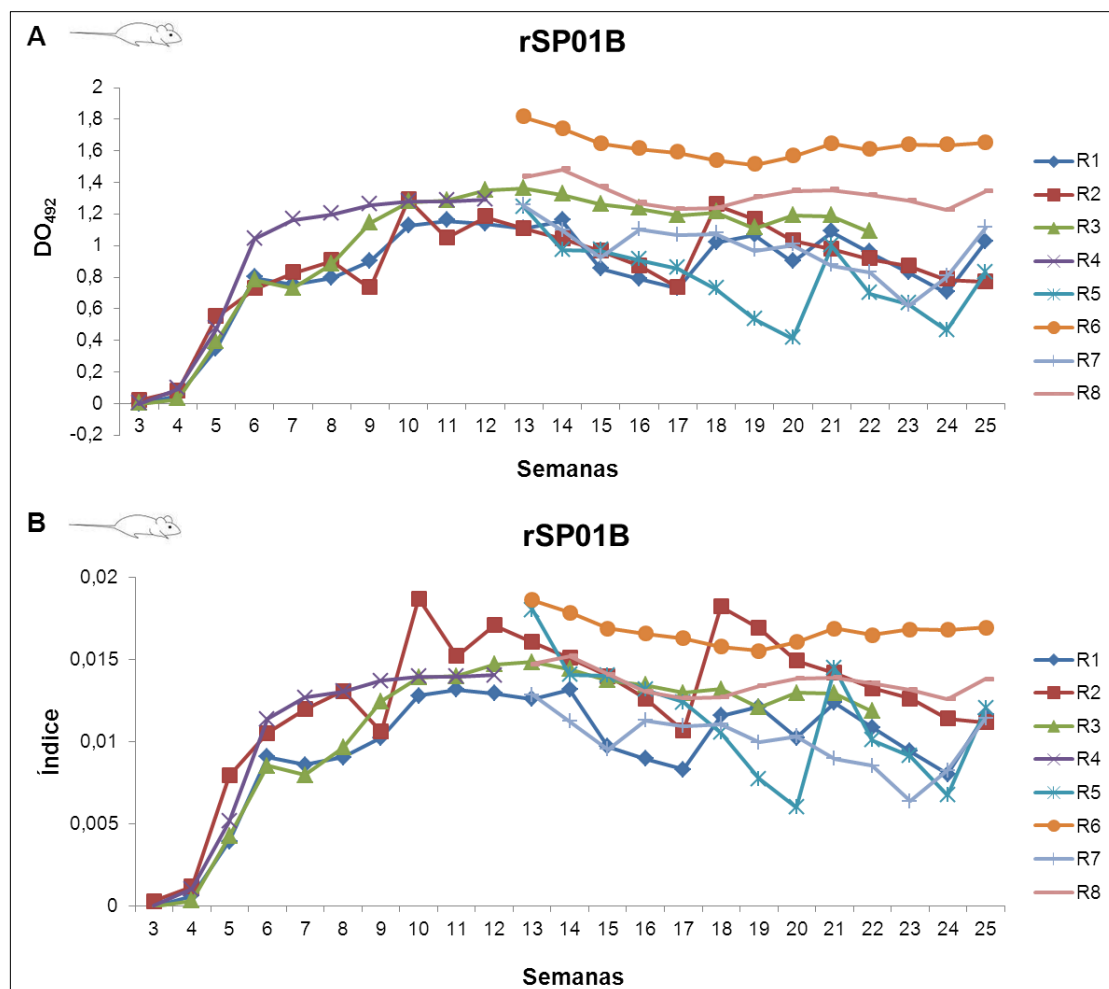


Figura 69. Reconocimiento de las proteínas recombinantes de la saliva de *P. perniciosus* por los sueros de perro, mediante WB. rSP01B: 1 µg/pocillo; rSP04: 2 µg/pocillo; rSP08: 2 µg/pocillo; rGST: 1 µg/pocillo. El área de la membrana de PVDF correspondiente a cada pocillo se cortó en 4 partes que se incubaron con los sueros. (+) Control positivo (sueros de perros expuestos experimentalmente a las picaduras de *P. perniciosus*). (-): Control negativo (suero de un perro no expuesto). M: Marcador de peso molecular *BenchMark* (Invitrogen®).

#### **4.9 Estudio de la cinética de anticuerpos IgG presentes en sueros de ratones BALB/c frente a las proteínas recombinantes rSP01B y rSP04**

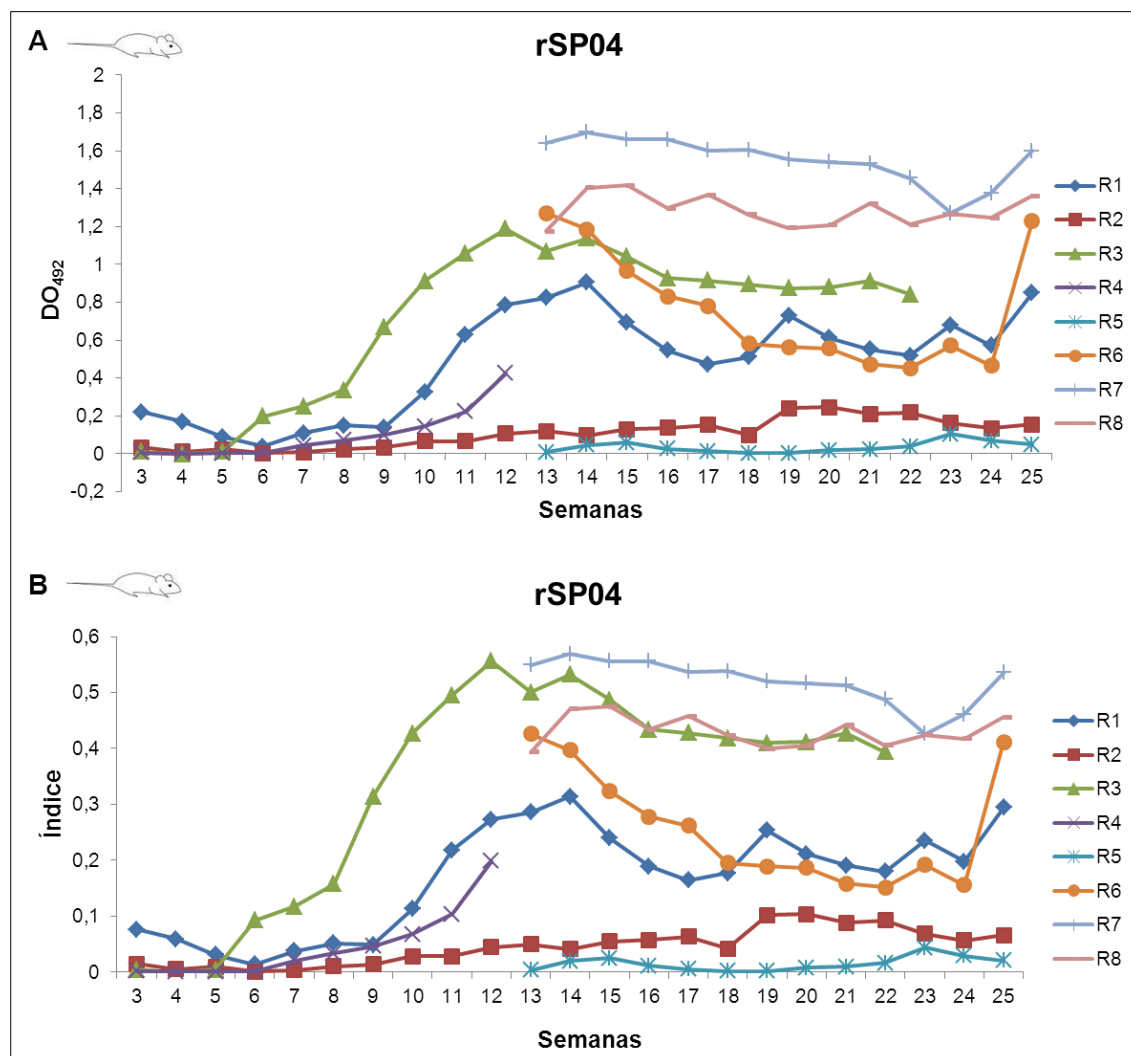
Los sueros de ratones BALB/c inmunizados a través de la picadura de *P. perniciosus*, mediante la Pauta 3 (Apartado 3.2.6.1), se evaluaron siguiendo el protocolo de ELISA *in house* descrito en el Apartado 3.2.10. Las placas de ELISA se tapizaron con 10 µg/ml de proteínas recombinantes y el conjugado anti IgG de ratón (AbD Serotec®) se utilizó a una dilución 1:500.

Los niveles de IgG presentes en los sueros de los ratones frente **rSP01B** aumentaron gradualmente con el transcurso de las inmunizaciones, siguiendo una cinética similar a la de los anticuerpos frente al extracto salival (Apartado 4.4.1 y Figura 39). Se alcanzaron niveles detectables de anticuerpos IgG específicos frente a rSP01B a la quinta semana de inmunización. Los niveles de anticuerpos siguieron aumentando hasta la semana 12, fin de las inmunizaciones. Durante las siguientes 12 semanas, los niveles de IgG se mantuvieron, o en algunos casos disminuyeron observándose oscilaciones para la mayoría de los sueros. La exposición de estos animales nuevamente a las picaduras de *P. perniciosus*, en la semana 24 del experimento, supuso un incremento de los niveles de IgG anti-rSP01B en la mayoría de los casos. En la Figura 70 se muestran los resultados de la cinética de anticuerpos frente a rSP01B, en DO<sub>492</sub> y en valores convertidos a índices para la normalización de los resultados, de acuerdo al Apartado 3.2.10.



**Figura 70. Cinética de anticuerpos IgG frente a rSP01B presentes en los sueros de los ratones BALB/c (Pauta 3 de inmunización). Niveles de anticuerpos expresados en: A) DO<sub>492</sub>. B) Índices.**

Los niveles de IgG frente a **rSP04** presentes en el suero de los ratones también aumentaron con el transcurso de las inmunizaciones. Sin embargo, los anticuerpos anti-rSP04 mostraron un incremento más paulatino, variable y de aparición tardía respecto a los anticuerpos frente al extracto salival y rSP01B (Figura 39 y 70, respectivamente). Cabe destacar, que se observaron respuestas dispares respecto a la respuesta de anticuerpos frente al extracto salival. Hubo ratones (R2 y R5) que apenas desarrollaron anticuerpos frente a la proteína rSP04, en comparación con la respuesta frente al extracto salival (Figura 39). Durante las semanas siguientes a la inmunización, los niveles de IgG se mantuvieron, o en algunos casos disminuyeron observándose oscilaciones. La exposición de estos animales nuevamente a las picaduras de *P. perniciosus*, en la semana 24 del experimento, generó respuestas variables. En la mayoría de los casos se observó un incremento de los niveles de IgG anti-rSP04, poniéndose de manifiesto un aumento muy notable en el suero de los ratones R1 y R6 (Figura 71).



**Figura 71. Cinética de anticuerpos IgG frente a rSP04 presentes en los sueros de los ratones BALB/c (Pauta 3 de inmunización). Niveles de anticuerpos expresados en: A) DO<sub>492</sub>. B) Índices.**

En ambos casos se muestran los resultados de la cinética de anticuerpos en DO<sub>492</sub> y en valores convertidos a índices (Apartado 3.2.10). Esta conversión a índices se realizó para normalizar los resultados y reducir las variaciones entre placas debidas a la técnica, obteniéndose gráficas muy similares en los dos casos.

En los ratones de los que se obtuvo sangre desde el inicio de los estudios (R1 a R4), se pudo establecer la relación entre el incremento del nivel de anticuerpos antisaliva y el número de picaduras acumuladas tras cada proceso de inmunización. En la Tabla 36 se muestran los niveles de IgG frente a las proteínas de la saliva presentes en los ratones y el número de picaduras acumuladas en cada animal.

Tabla 36. Niveles de anticuerpos frente a la saliva y proteínas recombinantes presentes en los sueros de los cuatro ratones (R1 a R4) y nº de picaduras en cada inmunización.

Ratón	Semana	Picaduras acumuladas	DO <sub>492</sub>		
			SGH	SP01B	SP04
R1	3	166	0,00025	-0,00280	0,22020
	4	191	0,03250	0,05345	0,16950
	5	287	0,22710	0,34565	0,08840
	6	361	0,75135	0,79745	0,03860
	7	418	1,09065	0,75325	0,10945
	8	527	1,25590	0,79350	0,14945
	9	621	1,50130	0,89930	0,13995
	10	764	1,65035	1,12505	0,32640
	11	876	1,70555	1,15605	0,62900
	12	1015	1,83055	1,13525	0,78700
	<b>13</b>	<b>1145</b>	<b>1,75470</b>	<b>1,10540</b>	<b>0,82390</b>
R2	3	193	0,01350	0,01890	0,03420
	4	263	0,13065	0,08010	0,01155
	5	342	0,34355	0,54780	0,02230
	6	413	0,69680	0,72610	0,00200
	7	446	0,75565	0,82545	0,00810
	8	562	1,04795	0,90135	0,02410
	9	659	0,99005	0,73195	0,03320
	10	809	1,08435	1,29000	0,06670
	11	936	0,95670	1,04870	0,06635
	12	1063	1,06045	1,17905	0,10585
	<b>13</b>	<b>1167</b>	<b>1,25020</b>	<b>1,10765</b>	<b>0,11825</b>
R3	3	169	0,01125	-0,00155	0,01010
	4	227	0,01355	0,02780	-0,00240
	5	351	0,17525	0,38870	0,01010
	6	424	0,47340	0,78265	0,19680
	7	441	0,59025	0,72955	0,25135
	8	532	0,70745	0,88295	0,33740
	9	581	0,70495	1,14125	0,67070
	10	672	0,92460	1,27455	0,91155
	11	781	0,96660	1,28410	1,05885
	12	863	0,98435	1,34890	1,18765
	<b>13</b>	<b>955</b>	<b>0,99045</b>	<b>1,36090</b>	<b>1,06925</b>
R4	3	192	0,00145	-0,00035	0,00430
	4	254	0,03720	0,09345	0,00140
	5	322	0,19820	0,47165	0,00240
	6	395	0,51320	1,04280	0,00435
	7	457	0,57045	1,16210	0,04420
	8	567	0,68105	1,19695	0,07150
	9	669	0,63105	1,25770	0,09845
	10	776	0,65155	1,27905	0,14440
	11	855	0,92530	1,28075	0,22210
	<b>12</b>	<b>972</b>	<b>0,90550</b>	<b>1,28905</b>	<b>0,42400</b>

El aumento de niveles IgG antisaliva se correlaciona positivamente con el número de picaduras recibidas (Tabla 37). El análisis de los datos convertidos a índices dio lugar a resultados similares.

**Tabla 37. Relación entre los niveles de IgG frente a las proteínas recombinantes rSP01B y rSP04 y el número de picaduras recibidas por cada ratón durante la fase de inmunización.**

Ratones	rSP01B		rSP04	
R1	r = 0'9091	p = 0'0001	r = 0'6545	p = 0'0289
R2	r = 0'9091	p = 0'0001	r = 0'7273	p = 0'0012
R3	r = 0'9909	p<0'0001	r = 0'9749	p<0'0001
R4	r = 1'000	p<0'0001	r = 0'9636	p<0'0001

Al comparar el nivel de los anticuerpos antisaliva con los anticuerpos frente a las proteínas recombinantes pudimos observar, una concordancia positiva, estadísticamente significativa para la mayoría de los ratones (Tabla 38). Tres ratones (R2, R5 y R8) no mostraron una correlación significativa entre los valores de IgG anti-rSP01B y el extracto total. En el caso de la rSP04 sucedió lo mismo en dos ratones (R5 y R8).

**Tabla 38. Comparación de los niveles de anticuerpos frente a SGH y las proteínas recombinantes, utilizando los sueros de ratones (Pauta 3).**

Ratones	rSP01B versus SGH		rSP04 versus SGH	
R1	r = 0'8785	p<0'0001	r = 0'8528	p<0'0001
R2	r = 0'3632	p = 0'0885	r = 0'6093	p = 0'0020
R3	r = 0'8526	p<0'0001	r = 0'8214	p<0'0001
R4	r = 0'9515	p<0'0001	r = 0'9152	p = 0'0002
R5	r = 0'2857	p = 0'3440	r = -0'4890	p = 0'0899
R6	r = 0'6868	p = 0'0095	r = 0'8242	p = 0'0005
R7	r = 0'7088	p = 0'0067	r = 0'7802	p = 0'0017
R8	r = 0'4505	p = 0'1223	r = 0'1154	p = 0'7074

#### 4.10 Estudio de la exposición de reservorios a las picaduras de *P. perniciosus* en el contexto del brote de leishmaniosis del suroeste de la CM

Se analizó la exposición a las picaduras de *P. perniciosus*, tanto de perros con propietario como de animales silvestres (liebres y conejos), en el escenario del mencionado brote. El estudio de la exposición de estos animales se realizó mediante la técnica de ELISA *in house* optimizada en la UEM (ISCIII) (Apartado 3.2.10). Los datos fueron altamente concordantes con los obtenidos mediante el ELISA desarrollado en el LBV (CUNI) (Apartado 3.2.9.2). Utilizando la misma batería de sueros de liebres y conejos, esta correlación alcanzó valores de  $r=0.9676$  y  $r=0.8681$ , respectivamente ( $p<0.0001$  en ambos casos).

##### 4.10.1 Estudio de sueros de animales silvestres

##### 4.10.1.1 Detección de anticuerpos IgG frente a la saliva de *P. perniciosus* presentes en los sueros de animales silvestres

Todos los sueros de las **liebres** capturadas en la zona cercana al brote de leishmaniosis humana de la CM ( $n=59$ ) mostraron niveles de anticuerpos IgG antisaliva significativamente superiores ( $p<0.0001$ ) a los niveles de IgG presentes en los sueros de las liebres de una zona no endémica (República Checa), tal y como se muestra en la Figura 72.

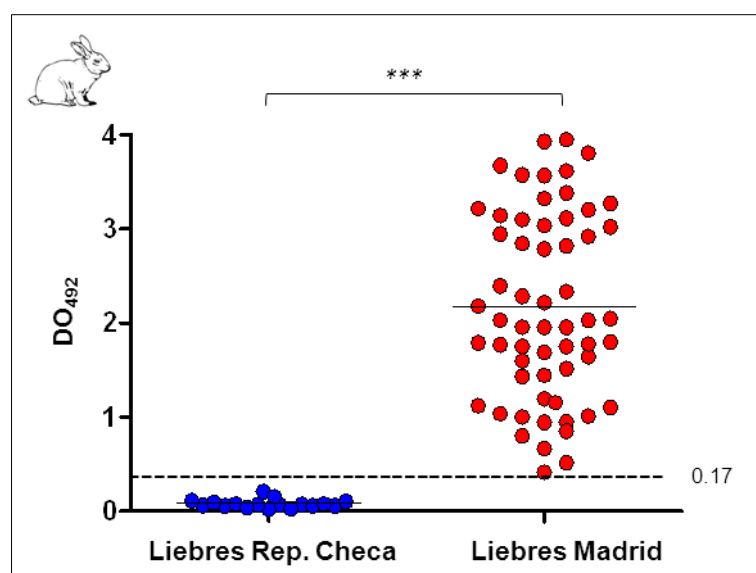


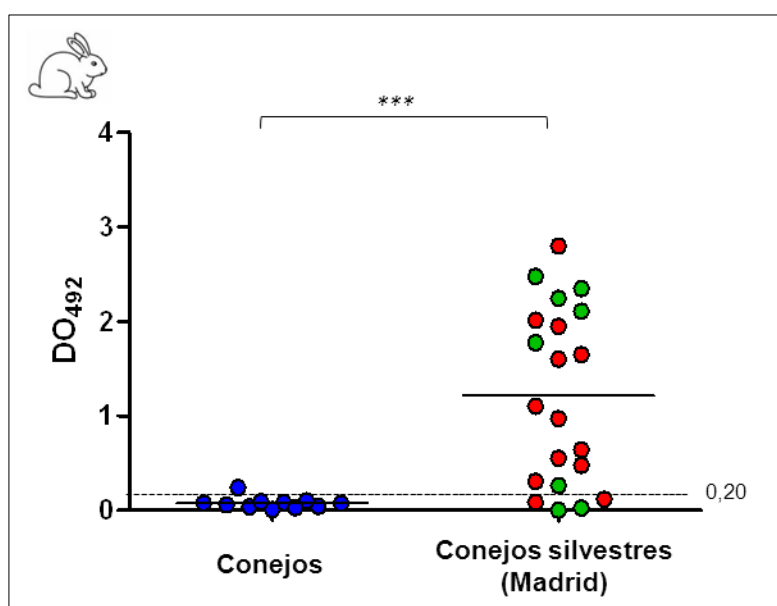
Figura 72. Niveles de anticuerpos IgG antisaliva de *P. perniciosus* presentes en los sueros de liebres. (●) Sueros de liebres no expuestas a las picaduras. (●): Sueros de liebres de la CM. (\*\*\*)  $p<0.0001$ .



El punto de corte de  $DO_{492}=0'17$  se estableció calculando la media de las absorbancias de los controles negativos ( $n=18$ ), más dos desviaciones estándar. Se observó una distribución muy heterogénea de los niveles de anticuerpos IgG antisaliva, desde valores muy bajos ( $DO_{492}=0'42$ ) hasta valores muy elevados ( $DO_{492}=3'95$ ) (Figura 72).

La mayoría de los sueros de **conejos** silvestres capturados en la CM (81%) mostraron niveles de anticuerpos antisaliva significativamente superiores ( $p<0'0001$ ) al punto de corte establecido con 11 sueros negativos procedentes de conejos mantenidos en el estabulario del ISCIII ( $DO_{492}=0'20$ ).

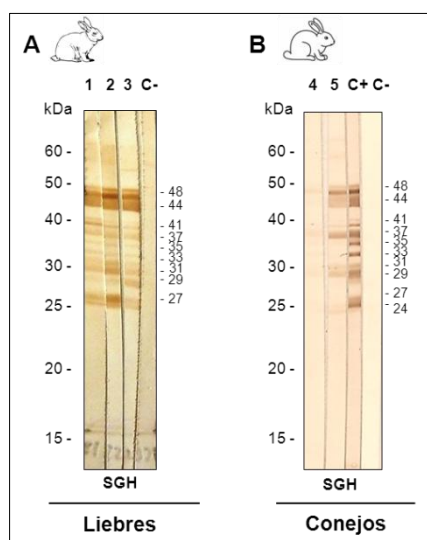
Los valores de absorbancia fueron más variables que los detectados en liebres, sin embargo, los niveles máximos de  $DO_{492}$  fueron menores en conejos. No se encontraron diferencias entre los niveles de anticuerpos antisaliva de conejos capturados durante 2011/2012 respecto a los de 2013 ( $p=0'59$ ) (Figura 73).



**Figura 73. Niveles de anticuerpos IgG antisaliva de *P. perniciosus* presentes en los sueros de conejos silvestres. (●) Sueros de conejos no expuestos a las picaduras. (●): Sueros de los conejos capturados durante 2011/2012. (●): Sueros de los conejos capturados durante 2013. (\*\*\*):**  $p<0'0001$ .

En función del nivel de anticuerpos obtenidos por ELISA se seleccionaron sueros de liebres y conejos para ser estudiados mediante *WB* con el extracto salival. Se determinaron así los antígenos responsables de la inmunogenicidad observada mediante ELISA. Los sueros de los animales silvestres reconocieron diferentes proteínas de la saliva, con una intensidad variable. Los sueros de las liebres reconocieron mayoritariamente las bandas de 48, 44, 31 y 27 kDa mientras que con los sueros de los conejos silvestres destacaron las

bandas de 48, 44, 37 y 31 kDa. Los sueros de estos animales reconocieron un menor número de bandas, y en menor intensidad que el suero del conejo expuesto experimentalmente a las picaduras de flebotomos (control positivo), que adicionalmente reconoció las bandas de 41, 35, 33 y 24 kDa (Figura 74).

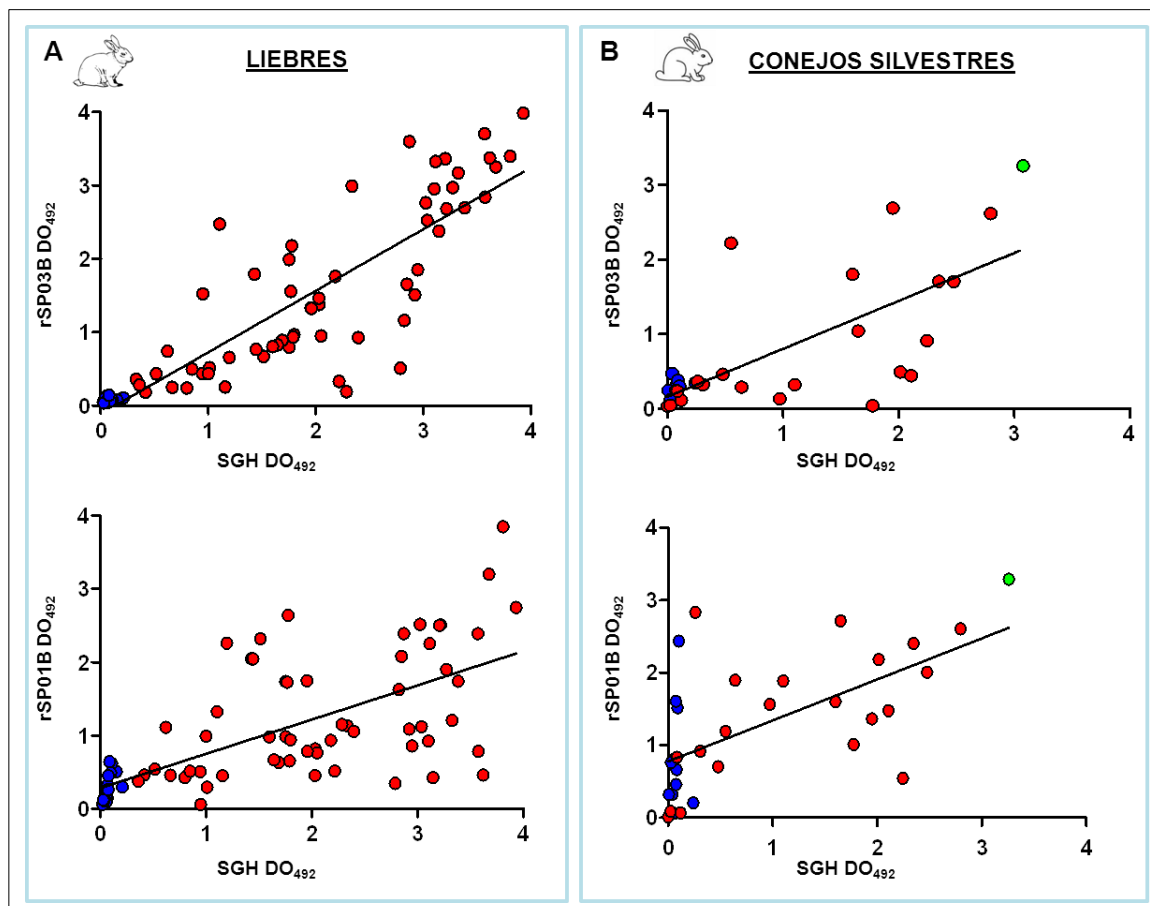


**Figura 74. Reconocimiento de las proteínas de la saliva de *P. perniciosus* (SGH) por los sueros de los lepóridos, mediante WB. A) Sueros de liebres (carriles 1-3). (C-) Control negativo (suero de una liebre de zona no endémica, República Checa). B) Sueros de conejos (carriles 4-5). (C-): Control negativo (suero de un conejo de estabulario). (C+): Control positivo de exposición (suero de un conejo experimentalmente expuesto a la picadura de *P. perniciosus*).**

#### 4.10.1.2 Detección de anticuerpos IgG frente a las proteínas recombinantes rSP03B y rSP01B de *P. perniciosus* presentes en los sueros de animales silvestres

En el estudio de la exposición a la saliva de animales procedentes del brote se evaluaron también los niveles de anticuerpos frente a varias proteínas recombinantes de la saliva. Utilizamos la apirasa rSP01B obtenida en nuestro laboratorio (10 µg/ml) y la proteína amarilla rSP03B (2 µg/ml) cedida por el LBV (CUNI) que, en experimentos previos no recogidos en esta Tesis, se había mostrado como un buen marcador de exposición a la picadura de flebotomos en perros.

Los niveles de anticuerpos IgG, presentes en los sueros de conejos y liebres silvestres, frente a la proteína amarilla rSP03B en su forma desnaturalizada, mostraron una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) con los niveles de anticuerpos IgG detectados frente al extracto total de la saliva (Figura 75).



**Figura 75. Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG, mediante ELISA, frente al extracto salival y a las proteínas recombinantes rSP03B y rSP01B, detectados en los sueros de los lepóridos. A) Liebres. B) Conejos.**

Los resultados del test de Spearman fueron:  $r=0.9015$  en liebres y  $r=0.7100$  en conejos. La proteína apirasa rSP01B en forma renaturalizada, obtenida según se detalla en el Apartado 3.2.8, mostró también una correlación positiva significativa ( $p<0.0001$ ) con el extracto salival,  $r=0.7099$  en liebres y  $r=0.6661$  en conejos.

Se constató el reconocimiento específico de las proteínas recombinantes rSP03B y rSP01B por los sueros de estos animales, mediante *WB* (Figura 76A y B).

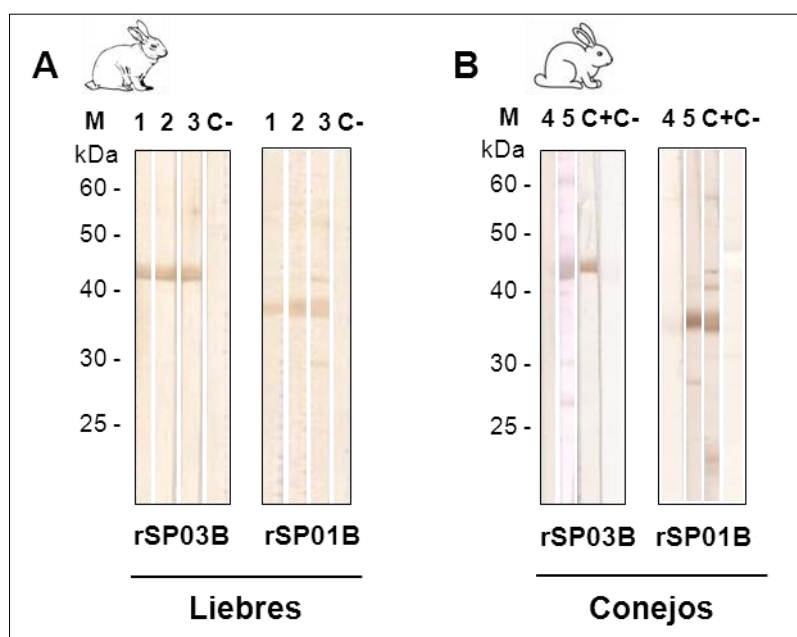
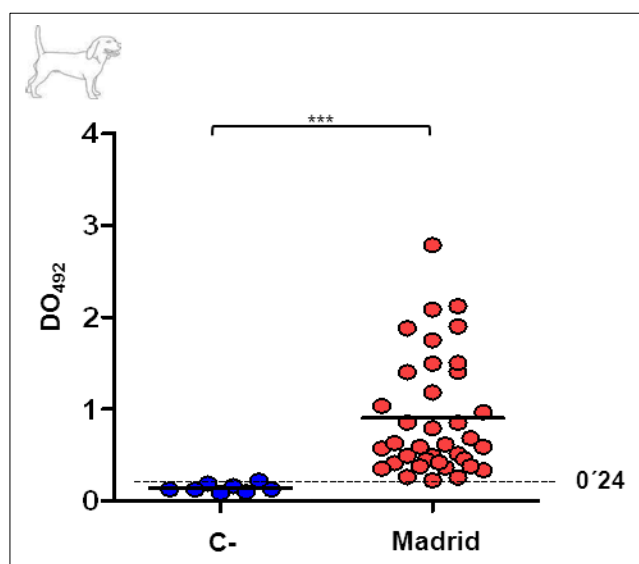


Figura 76. Reconocimiento de las proteínas recombinantes rSP03B y rSP01B por los sueros de los lepóridos, mediante *WB*. A) Sueros de liebres (carriles 1-3). (C-): Control negativo (suero de liebre de zona no endémica, República Checa). B) Sueros de conejos (carriles 4-5). (C-): Control negativo (suero de conejo de estabulario). (C+): Control positivo (suero de un conejo experimentalmente expuesto a la picadura de *P. perniciosus*).

#### 4.10.2 Estudio de sueros de perros

Todos los sueros de perros con propietario, residentes en la zona de Fuenlabrada y Leganés ( $n=37$ ), presentaron niveles de anticuerpos antisaliva altamente dispersos y significativamente superiores ( $p<0'0001$ ) al punto de corte ( $DO_{492}=0'24$ ) establecido con 6 sueros de perros no expuestos a la picadura. (Figura 77).



**Figura 77. Niveles de anticuerpos IgG antisaliva de *P. perniciosus*, mediante ELISA, presentes en los sueros de los perros con propietario, residentes en el suroeste de la CM. (●): Sueros de perros no expuestos a las picaduras. (●): Sueros de perros de la CM. (\*\*\*):**  $p<0'0001$ .

Tras la consulta de la información recopilada en las encuestas epidemiológicas, llevadas a cabo durante la campaña de vacunación antirrábica en perros, se organizaron los resultados de niveles de anticuerpos antisaliva, en dos grupos, según su potencial exposición a los flebotomos (Tabla 20). En la Figura 78 se puede observar cómo los sueros de los perros que poseían algún factor de riesgo a la exposición de la picadura de los flebotomos (Grupo 2) mostraron niveles de anticuerpos antisaliva significativamente superiores ( $p=0'021$ ) que los sueros de los perros con un riesgo de exposición a la picadura de los flebotomos teóricamente limitado (Grupo 1).

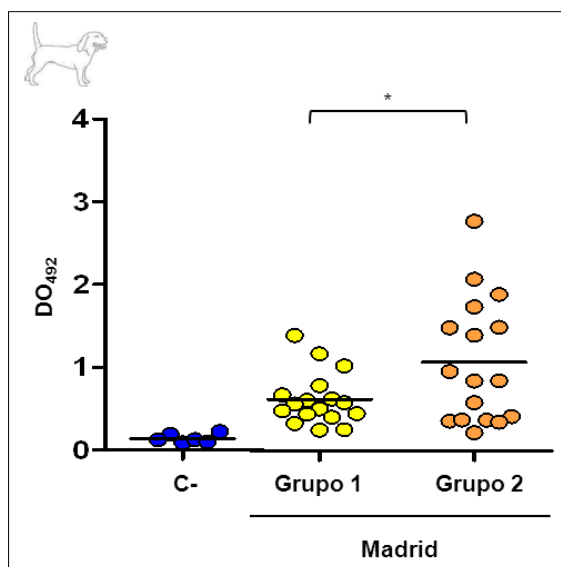


Figura 78. Niveles de anticuerpos IgG antisaliva de *P. perniciosus* presentes en los sueros de los perros con propietario residentes en el suroeste de la CM. (●): Sueros de perros no expuestos a las picaduras. (●): Grupo 1: Perros con un bajo nivel de exposición a los flebotomos. (●): Grupo 2: Perros con un elevado nivel de exposición a los flebotomos. (\*):  $p < 0.05$ .

La evaluación de la respuesta IgG frente a la proteína recombinante rSP03B, en su forma desnaturalizada (proporcionada por el LBV, CUNI), evidenció una correlación estadísticamente significativa ( $r = 0.9040$ ;  $p < 0.0001$ ) entre los niveles de anticuerpos presentes en los sueros de perros obtenidos frente al extracto salival y frente a esta proteína recombinante (Figura 79).

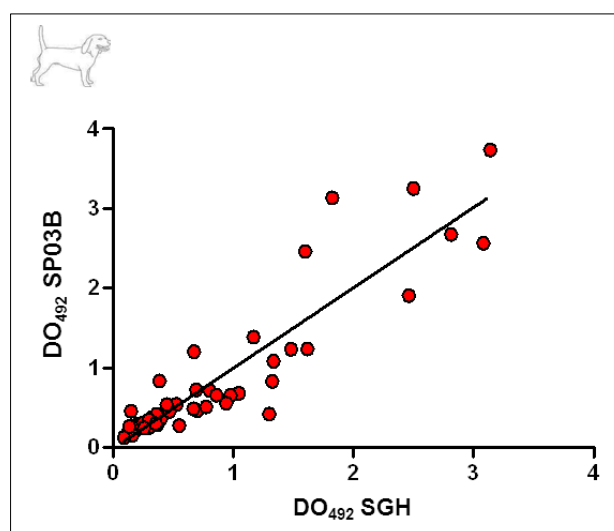


Figura 79. Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG detectados en los sueros de perros, mediante ELISA, frente al extracto salival y la proteína recombinante rSP03B.









## 5 DISCUSIÓN

Antiguamente se pensaba que la función de la saliva de los insectos hematófagos consistía únicamente en lubricar, limpiar las piezas bucales y ayudar en la digestión de los azúcares y de la sangre. Sin embargo, actualmente se sabe que la saliva, además de ejercer estas funciones básicas, contiene una serie de sustancias bioactivas que contrarrestan la hemostasia y alteran la respuesta inmune del hospedador con el fin de asegurar el éxito de la succión de sangre. Estas propiedades otorgan a la saliva un papel relevante en la transmisión de *Leishmania*. Es por ello que prestigiosos grupos de investigación están progresando en el estudio de la saliva de los flebotomos, explorando su potencial como vacunas frente a la leishmaniosis o como marcador de exposición a la picadura de los mismos.

Los experimentos recogidos en esta Tesis Doctoral se han centrado en el estudio de la saliva de *P. perniciosus*, principal vector de *L. infantum* en la cuenca mediterránea occidental. En una fase inicial, se realizó la caracterización del contenido proteico de la saliva de este vector e identificación de las proteínas antigénicas presentes en su saliva, lo que nos permitió seleccionar varios antígenos que fueron posteriormente producidos en forma de proteínas recombinantes. Dichas proteínas se evaluaron como marcadores de la exposición a la picadura de *P. perniciosus*. Finalmente, se han estandarizado técnicas que han permitido analizar el grado de exposición a la picadura de *P. perniciosus* de los reservorios domésticos y silvestres en el contexto del brote de leishmaniosis de la CM.

### 5.1 Descripción del patrón proteico de la saliva de *P. perniciosus*

El patrón proteico de la saliva de *P. perniciosus* se corresponde con el obtenido previamente por otros autores (Volf y col., 2000; Volf y Rohoušová, 2001; Anderson y col., 2006; Vlková y col., 2011). En la colonia de *P. perniciosus* procedente de Madrid demostramos que el contenido proteico de las glándulas salivales varía cuantitativa y cualitativamente en función de la edad existiendo un incremento gradual del contenido proteico directamente proporcional a la edad de los flebotomos. Estos resultados están en concordancia con lo anteriormente descrito en otras especies de los géneros *Phlebotomus* (*P. papatasi*, y *P. langeroni*) y *Lutzomyia* (*L. longipalpis*, *L. ovallesi* y *L. migonei*) (Volf y col., 2000; Prates y col., 2008; Nieves y col., 2011; Abdel-Badei y col., 2012).

Las diferencias en la composición de la saliva se relacionan con la distancia taxonómica entre especies (Volf y col., 2000; Anderson y col., 2006; Coutinho-Abreu y col.,

2011). En los experimentos recogidos en esta Tesis, se encontraron diferencias muy marcadas al comparar el patrón proteico de la saliva de *P. perniciosus* con el de *P. argentipes*. No se observaron diferencias en el perfil proteico de las tres colonias de *P. perniciosus* estudiadas, procedentes de diversas zonas de España (Madrid, Zaragoza y Valencia), tal y como ocurre en *P. papatasi* capturados en diferentes zonas de Irán (Akhavan, 2011) o *P. orientalis* de dos regiones distantes de Etiopía (Vlková y col., 2014). Estos resultados concuerdan con otros estudios a nivel transcriptómico, en los que se ha demostrado que las poblaciones de flebotomos de diferente origen geográfico presentan transcritos salivales altamente conservados (Kato y col., 2006; Abdeladhim y col., 2012; Vlková y col., 2014). Sin embargo, otros autores han descrito diferencias en el perfil proteico para colonias de *P. duboscqi* originarias de Senegal y Etiopía, así como para *P. papatasi* procedentes de Chipre y Arabia Saudí (Volf y col., 2000).

Las técnicas proteómicas son de gran valor en el campo de la entomología médica y han permitido la identificación de las proteínas implicadas en la interacción patógeno-vector (Rachinsky y col., 2008; Serrano-Pinto y col., 2010; Chen y col., 2011; Kongsuwan y col., 2011), así como de proteínas de la saliva de garrapatas, triatominos, culícidos y moscas tse-tse (Valenzuela y col., 2003; Valenzuela y col., 2004; Kalume y col., 2005; Charneau y col., 2007; Choumet y col., 2007; Oleaga y col., 2007; Rachinsky y col., 2008; Xu y col., 2008; Schwarz y col., 2009a; Wasinpiyamongkol y col., 2009; Alves-Silva y col., 2010; Assumpcao y col., 2010; Bussacos y col., 2011; Costa y col., 2011; Kongsuwan y col., 2011).

La mayoría de proteínas salivales de los flebotomos han sido descritas mediante la separación por electroforesis monodimensional del extracto salival, seguida de la identificación de proteínas por degradación de Edman (Valenzuela y col., 2001a; Valenzuela y col., 2001b; Valenzuela y col., 2004; Anderson y col., 2006; Kato y col., 2006; Oliveira y col., 2006). Posteriormente, también se ha empleado la espectrometría de masas como herramienta para la identificación de las proteínas salivales (Hostomská y col., 2009; Marzouki y col., 2011; Rohoušová y col., 2012; de Moura y col., 2013). Hasta la fecha no existen trabajos del análisis de la saliva de los flebotomos mediante electroforesis bidimensional, por lo que los estudios plasmados en esta Tesis Doctoral suponen la primera elaboración de mapas proteómicos de la saliva de una especie de flebotomo: *P. perniciosus* (Martín-Martín y col., 2012). Adicionalmente y siguiendo la misma metodología, en estudios posteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio se elaboraron mapas proteómicos de la saliva de *P. argentipes* (Martín-Martín y col., 2013a).

El patrón proteico de la saliva de *P. perniciosus* reveló al menos 25 *spots* con un amplio rango de peso molecular (15-50 kDa), distribuidos en dos grupos bien diferenciados en función de su pI. Un grupo se localiza alrededor del pI 4 a 6 mientras que la mayoría de las proteínas aparecen alrededor del pI 9. Se llevaron a cabo electroforesis mono y bidimensionales en paralelo, lo que permitió confirmar la correspondencia del patrón obtenido por ambas metodologías, validando el uso de la electroforesis bidimensional para la caracterización de la saliva de los flebotomos. Todas las réplicas realizadas para cada condición mostraron un patrón similar, asegurando la reproducibilidad de la técnica. Por otro lado, se intentó mejorar la separación de las proteínas básicas de la saliva. La introducción de diversos cambios como son la utilización de tiras IPG de pH 7 a 10 y 7 a 11 y una disminución de cantidad de proteína y de anfolitos, apenas se tradujo en una mejora respecto a la resolución de los geles iniciales con tiras IPG de pH 3 a 10.

La mayor parte de las secuencias de proteínas salivales anotadas en las bases de datos de la saliva de *P. perniciosus* proceden de flebotomos originarios de Italia y derivan del análisis de una genoteca de ADNc de glándulas salivales (Anderson y col., 2006). Estos autores describieron 20 hipotéticas proteínas salivales mediante degradación de Edman identificando la presencia de 13 en el proteoma. Algunas de las proteínas identificadas por los autores citados anteriormente, no pudieron ser detectadas en los experimentos presentados de electroforesis bidimensional en combinación con la espectrometría de masas (2DE-MS). La escasa abundancia de estas proteínas o sus características bioquímicas inherentes, tales como un bajo peso molecular o un pI muy alcalino, podría haber dificultado la focalización de las proteínas en las tiras IPG y, por tanto, se explicaría la ausencia de varias proteínas salivales, previamente descritas, entre las identificadas en nuestros experimentos. Sin embargo, SP08, una de las proteínas más abundantes identificadas por 2DE-MS no se había descrito por degradación de Edman (Anderson y col., 2006). No obstante, aún existen proteínas anotadas mediante transcriptómica que no han sido identificadas por degradación de Edman o espectrometría de masas.

En la mayoría de los casos se obtuvo una buena concordancia entre los valores experimentales y teóricos de masa y pI, sin embargo, se observaron algunas discordancias destacables, lo que sugiere la presencia de isoformas o modificaciones postraduccionales. Otros autores ya habían observado desplazamientos de movilidad electroforética de varias proteínas salivales después de su separación monodimensional (Valenzuela y col., 2001a; Anderson y col., 2006; Rohoušová y col., 2011b). La redundancia de **isoformas** en las proteínas salivales ha sido descrita en otros artrópodos. De hecho, este fenómeno se ha relacionado con la evolución y adaptación evolutiva de los insectos para asegurar la

alimentación sanguínea (Francischetti y col., 2005). Por ejemplo, en el proteoma de la saliva de la garrapata *Ornithodoros moubata*, 17 *spots* se identificaron como la misma proteína, TSGP1 (Oleaga y col., 2007). El mismo hallazgo se observó en la saliva del triatmino *Panstrongylus megistus*, donde se encontraron varias isoformas de las lipocalinas, proteínas implicadas en el transporte de moléculas tales como la histamina y el óxido nítrico (Bussacos y col., 2011). De la misma manera, en los experimentos realizados, algunos *spots* que presentaban diferente movilidad en los geles dieron lugar a la identificación de una única proteína. Concretamente, 4 de las 10 proteínas identificadas se detectaron en múltiples *spots* (SP03, SP03B, SP08 y SP16 de *P. ariasi*).

Los cambios en movilidad electroforética también podrían atribuirse a la presencia de **modificaciones postraduccionales**. Los estudios bioinformáticos realizados para predecir los sitios de fosforilación y glicosilación apoyan esta hipótesis, ya que la mayoría de las proteínas de la saliva de *P. perniciosus* presentan potenciales modificaciones postraduccionales (Tabla 22). Concretamente, una única proteína ha sido identificada en varios *spots* adyacentes que comparten el mismo peso molecular pero difieren ligeramente en el pI (Tabla 21). Esta observación podría ser un reflejo de los procesos de fosforilación ya que este tipo de modificación postraduccional suele aparecer como una sucesión de *spots* lineales en los geles (Vitorino y col., 2004).

Por otro lado, se identificó una proteína de *P. ariasi* y otra de *P. argentipes* en la saliva de *P. perniciosus* (GenBank: AAX55660 y ABA12144, respectivamente). Los datos obtenidos, mediante la comparación por BLAST de las secuencias de los péptidos concretos identificados con sus proteínas homólogas en *P. perniciosus*, sugieren que estos péptidos podrían corresponder a SP04 y SP09 de *P. perniciosus*, respectivamente. Si bien, aunque con menor probabilidad, podrían tratarse de proteínas no anotadas hasta la fecha en las bases de datos. En tal caso, el programa de asignación de proteínas a partir de los péptidos identificados no sería capaz de discriminar entre proteínas nuevas no anotadas y polimorfismos de proteínas ya descritas.

Estos resultados indican que la técnica de electroforesis bidimensional, utilizada para la descripción de las proteínas salivales de *P. perniciosus*, complementa los datos previos aportados por otros autores y contribuye a un mejor conocimiento de las isoformas y modificaciones postraduccionales de las proteínas salivales.

## 5.2 Inmunización de animales con la saliva a través de las picaduras de *P. perniciosus* y cinética de anticuerpos antisaliva

La inmunización de diferentes vertebrados tuvo como finalidad obtener sueros hiperinmunes para la detección de antígenos salivales. El estudio de los efectos de la alimentación de los flebotomos con sangre de diferentes orígenes no se planteó como un objetivo de esta Tesis. Sin embargo, las observaciones realizadas durante el transcurso de los experimentos indican un mayor porcentaje de alimentación sobre cricetos que sobre ratones. La preferencia de los flebotomos por los diferentes vertebrados parece depender, entre otros factores, de la especie de flebotomo, ya que, otros autores determinaron que, *P. argentipes* ofrecía mejores porcentajes de alimentación sobre ratones que sobre cricetos (Ghosh y Mukhopadhyay, 1998). Los elevados porcentajes de alimentación obtenidos en los experimentos de inmunización de conejos a través de la picadura de *P. perniciosus* (Apartado 4.4.2) concuerdan con los experimentos de otros autores que demuestran que los conejos son una importante fuente de alimentación sanguínea para las especies del subgénero *Larroussius* (Killick-Kendrick y Killick-Kendrick, 1991; Benito-De Martín y col., 1994; Volf y Volfova, 2011).

Algunos autores han sugerido la posible **interferencia de los anticuerpos antisaliva con los parámetros biológicos de los flebotomos**, debido a la formación de complejos antígeno-anticuerpo (Ingonga y col., 1996; Vilela y col., 2006). Si la sangre ingerida procede de un hospedador altamente expuesto a las picaduras que, por tanto, ha desarrollado anticuerpos antisaliva, el flebotomo alimentado con esa sangre entrará en contacto directo con los anticuerpos antisaliva generados por el hospedador. Otros autores han relacionado un incremento de la tasa de mortalidad de *P. argentipes* y *L. longipalpis* con la presencia de anticuerpos antisaliva presentes en animales de experimentación (Ghosh y Mukhopadhyay, 1998; Vilela y col., 2006). También se ha descrito una disminución del volumen de sangre ingerida y una fecundidad reducida en *L. longipalpis* alimentadas sobre ratones previamente inmunizados con la saliva de este vector o con el péptido sintético maxadilano (Milleron y col., 2004b). Sin embargo, durante los procesos de inmunización realizados en esta Tesis no se observó una relación aparente entre el incremento gradual de los anticuerpos antisaliva y un ascenso en la mortalidad de los flebotomos alimentados. Estos resultados concuerdan con la ausencia de relación encontrada entre la mortalidad de *P. duboscqi* alimentadas sobre cricetos inmunizados y no inmunizados a través de la picadura, sugiriendo que la cantidad de sangre ingerida no contiene suficientes anticuerpos como para interferir en los procesos biológicos del flebotomo (Kaburi y col., 2011).

La **inmunización de ratones, cricetos y conejos con la saliva** de los flebotomos a través de la picadura de hembras no infectadas permitió obtener sueros hiperinmunes específicos de forma satisfactoria. Se estableció una relación directamente proporcional entre el número de picaduras y el nivel de anticuerpos antisaliva en ratones y conejos (Apartado 4.4). Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos previamente por otros autores en ratones y perros expuestos experimentalmente a *P. papatasi* y *P. perniciosus*, respectivamente, en los que se puso de manifiesto una correlación entre el número de picaduras y los niveles de anticuerpos IgG antisaliva (Vlková y col., 2011; Vlková y col., 2012).

En la literatura se han descrito diversas pautas de exposición a los flebotomos para la generación de anticuerpos antisaliva, no existiendo un claro consenso. Resulta complejo determinar una pauta que se adecue a la exposición de los vertebrados a los flebotomos en la naturaleza, ya que en gran parte dependería de factores propios de cada ecosistema tales como la densidad y preferencias alimenticias de los flebotomos. Recientes estudios han demostrado que modificaciones en las pautas de exposición a las picaduras conllevan notables diferencias en el efecto protector de la saliva frente a la progresión de la leishmaniosis en un modelo murino (Rohoušová y col., 2011a). Con el fin de mejorar el conocimiento de la **cinética de los anticuerpos antisaliva en ratones**, llevamos a cabo un experimento en el que los animales que se sometieron a una exposición de larga duración (12 semanas, Pauta 3) y se sangraron semanalmente para realizar un seguimiento de la respuesta de anticuerpos. Los niveles de anticuerpos fueron detectables a la cuarta semana, y continuaron en ascenso durante las 12 semanas de inmunización, resultados que coinciden con estudios realizados por otros autores sobre la cinética de los anticuerpos antisaliva de *P. papatasi* en ratones BALB/c y CL57/BL6 (Vlková y col., 2012). Dichas observaciones podrían explicar por qué los ratones inmunizados durante tan sólo tres semanas (Pauta 2) no generaron elevados niveles de anticuerpos antisaliva, hecho que podría deberse al menor número de picaduras recibidas o, con mayor probabilidad, al momento temprano de la respuesta inmune en el que aún se encontraban. Esta misma observación la realizaron otros autores en experimentos con ratones expuestos semanalmente durante 2 semanas a las picaduras de *P. duboscqi*, ya que estos animales apenas generaron una respuesta humoral frente a la saliva del flebotomo (Rohoušová y col., 2011a).

Durante las 12 semanas posteriores a la última inmunización realizada en ratones BALB/c (Pauta 3), los niveles de IgG se mantuvieron en la mayoría de los casos o disminuyeron ligeramente. En experimentos de exposición de ratones BALB/c a las

picaduras de *P. duboscqi* realizados por otros autores, se observa una notable disminución de los niveles de anticuerpos salivales tras 15 semanas después de la última exposición (Rohoušová y col., 2011a). Una nueva exposición a la saliva de *P. perniciosus* en forma de inmunización de recuerdo, a las 24 semanas (Pauta 3), supuso un incremento de los niveles IgG superando, en la mayoría de los casos, los niveles máximos que habían presentado tras la fase de inmunización. Este resultado denota la activación de las células B de memoria. De forma similar, en ratones inmunizados con la saliva de *P. papatasi* se ha reportado una respuesta de células B de memoria específicas, 20 semanas después de la última exposición (Vlková y col., 2012), hecho que también se ha demostrado en humanos expuestos natural y experimentalmente a la saliva de *P. argentipes* y *L. longipalpis*, respectivamente (Vinhas y col., 2007; Clements y col., 2010).

Los **anticuerpos antisaliva presentes en conejos** siguieron una cinética algo diferente a la observada en ratones. La detección de anticuerpos antisaliva de tipo IgG se hizo patente de forma más temprana que en los ratones, concretamente a la segunda semana de inmunización, tal y como ocurre en perros expuestos a las picaduras de *P. perniciosus* (Vlková y col., 2011). Además, tras un pronunciado ascenso inicial, los niveles se mantuvieron estabilizados en valores muy elevados durante toda la fase de exposición (4 u 8 semanas) y posterior seguimiento hasta la semana 21, (Apartado 4.4.2) Cabe destacar que los niveles permanecieron estables incluso hasta 5 meses después de la última inmunización.

En otros estudios, los niveles de IgG antisaliva presentes en el suero de perros expuestos experimentalmente a las picaduras de *L. longipalpis* y *P. perniciosus* se reducen a la mitad después del periodo de inmunización y se mantienen en esos niveles durante el tiempo estudiado, que alcanzó las 29 semanas en el caso de la exposición a *L. longipalpis* (Hostomská y col., 2008; Vlková y col., 2011). Los estudios realizados en humanos muestran un ascenso gradual de los niveles de IgG antisaliva, durante la fase de exposición experimental a las picaduras de *L. longipalpis* (Vinhas y col., 2007). En humanos expuestos a las picaduras de *P. argentipes*, se produce también una posterior disminución de los niveles de IgG antisaliva, cuantificada en un 30% de media, a las 4 semanas después de la última exposición natural a este vector (Clements y col., 2010). Además, en la población india se ha estimado que la vida media de los anticuerpos IgG antisaliva de *P. argentipes* es de 166 días (Clements y col., 2010).

Las reacciones inmunológicas frente a la saliva son complejas y cada componente de la saliva puede generar un patrón de respuesta inmune diferente a nivel individual (Barral



y col., 2000). Estos datos justifican la necesidad de profundizar en el estudio de la cinética de los anticuerpos antisaliva. En esta línea, hemos realizado experimentos para abordar la **cinética que siguen los anticuerpos frente a las proteínas recombinantes rSP01B y rSP04** de la saliva de *P. perniciosus* presentes en los sueros de ratones inmunizados. Se incluyeron controles positivos y negativos para poder normalizar los resultados. En el caso de la determinación de la cinética de los anticuerpos frente a la saliva y frente a las proteínas recombinantes rSP01B y rSP04, las lecturas de densidad óptica se transformaron en índices y así se consiguió reducir la variabilidad entre las placas de ELISA. Esta diferencia se hace patente sobre todo en la determinación de anticuerpos frente al extracto salival y frente a rSP01B en sueros de ratones.

Los ratones desarrollaron niveles de anticuerpos frente a ambas proteínas recombinantes que se correlacionaron positivamente con el número de picaduras recibidas (Tabla 36), de la misma manera que sucedía con los niveles de anticuerpos frente al extracto salival (Figura 39). A medida que progresaron las inmunizaciones, los niveles de anticuerpos frente a rSP01B y rSP04 fueron aumentando gradualmente y se hicieron patentes desde la quinta semana, a diferencia de los anticuerpos frente al extracto salival que aparecieron a la cuarta semana de inmunización. Esta discordancia puede deberse a que la señal frente al extracto salival detectada a la cuarta semana se corresponda con anticuerpos frente a otras proteínas que componen la saliva, y que los anticuerpos responsables de la respuesta frente a SP01B y SP04 aparezcan con posterioridad. Los anticuerpos frente a las proteínas rSP01B y rSP04 siguen una cinética similar a los anticuerpos frente al extracto salival. Cabe destacar que los ratones presentaron una respuesta de tipo IgG frente a rSP04 más heterogénea que la desarrollada frente al extracto o rSP01B. Además, dos de los ratones, no desarrollaron una respuesta apreciable frente a la proteína rSP04, poniendo de manifiesto las diferencias interindividuales de la respuesta inmune. De forma similar, perros inmunizados con proteínas recombinantes de la saliva de *L. longipalpis* (proteína amarilla LJM17, GenBank: AF132518 y lufaxina LJL143, GenBank: AY445936) muestran una respuesta humoral estable frente a dichas proteínas durante los 7 meses siguientes a la inmunización, además de destacar una respuesta de células B de memoria (Collin y col., 2009).

### **5.3 Identificación de antígenos salivales**

Para la identificación de los antígenos presentes en la saliva de *P. perniciosus* se utilizaron los sueros de ratones, cricetos y conejos inmunizados experimentalmente. Concretamente, en el caso de los ratones, se emplearon los sueros procedentes de la

inmunización de acuerdo a la Pauta 1, ya que presentaban un nivel de anticuerpos superior a los de la Pauta 2, según los resultados obtenidos mediante ELISA.

Los lotes de sueros de ratones y cricetos inmunizados con saliva reconocieron las bandas proteicas de 44, 37 y 29 kDa, mediante *WB* tras la **electroforesis monodimensional** (Apartado 4.3). El mismo lote de sueros de cricetos reconoció también las bandas proteicas de 52, 35 y 27 kDa. El suero del conejo expuesto experimentalmente a las picaduras de *P. perniciosus* confirmó la antigenicidad de las bandas de aproximadamente 44, 37 y 29 kDa y, reconoció otras bandas de 48, 41, 35, 33, 27, 24 y 13 kDa. Los sueros de liebres y conejos silvestres, capturados en la zona del brote epidémico de leishmaniosis de la CM, mostraron diferencias en la intensidad y en el reconocimiento de las proteínas de la saliva de *P. perniciosus*. Las bandas proteicas que mostraron una mayor antigenicidad para las liebres y conejos silvestres se observaron alrededor de 48, 44, 37, 31, 29 y 27 kDa.

De las proteínas salivales mayoritarias de *P. perniciosus*, las bandas alrededor de 44 kDa suelen corresponder con las proteínas amarillas, mientras que las apirinas aparecen alrededor de 35-37 kDa y las proteínas relacionadas con ParSP25 alrededor de 27-29 kDa (Anderson y col., 2006; Vlková y col., 2011). Estas proteínas de la saliva de *P. perniciosus* ya han sido previamente descritas como antígenos, utilizando sueros de animales experimental o naturalmente expuestos a las picaduras de este vector (Volf y Rohoušová, 2001; Vlková y col., 2011). Además, las proteínas de aproximadamente 44, 35 y 29 kDa han sido descritas como potentes inmunógenos en otras especies de flebotomos. Concretamente, en *P. papatasi* y *P. sergenti* estas proteínas fueron reconocidas por sueros de humanos residentes en una zona endémica con presencia de estos dos vectores. Lo mismo sucede con los sueros de ratones inmunizados experimentalmente a través de la picadura de dichas especies (Rohoušová y col., 2005a).

La utilización de la **electroforesis bidimensional**, como proceso de separación de las proteínas, seguido de *WB*, permitió la identificación de diversos antígenos (Apartado 4.3). La combinación de ambas metodologías se ha mostrado útil en la detección de antígenos en la saliva de otros artrópodos, tales como garrapatas (Oleaga y col., 2007), triatominos (Schwarz y col., 2009a) y culícidos (Wasinpiyamongkol y col., 2009). En este aspecto no existen datos disponibles en la literatura acerca de la saliva de los flebotomos, por lo que, los experimentos mostrados aquí han supuesto la primera aproximación en la identificación de antígenos salivales, mediante electroforesis bidimensional y *WB*.

Las proteínas amarillas (SP03 y SP03B), las apirinas (SP01 y SP01B) y la proteína relacionada con ParSP25 (SP08) fueron reconocidas por los sueros de ratones y cricetos. Sin embargo, las proteínas relacionadas con D7 resultaron ser antigénicas sólo para los sueros de los cricetos. Estos resultados son consistentes con las bandas detectadas en los experimentos de *WB* tras la electroforesis monodimensionales (Apartado 4.3) y concuerdan con los antígenos salivales de *P. perniciosus* descritos anteriormente por otros autores en estudios del reconocimiento por sueros de cricetos y conejos, mediante *WB* (Volf y Rohousova, 2001).

Se observaron también diferencias en la intensidad del reconocimiento de las proteínas salivales por los sueros de ratones y de los cricetos, hecho que pone de manifiesto la utilidad de las inmunizaciones de estas dos especies de animales ya que amplía el número de proteínas inmunogénicas a analizar. Estas diferencias pueden ser debidas a la variabilidad de la respuesta inmune desarrollada por los distintos vertebrados. Hallazgos similares han sido previamente descritos entre la intensidad del reconocimiento de la saliva por parte de sueros de ratones inmunizados mediante la picadura de *P. papatasi* y *P. sergenti* y de individuos residentes en zonas donde estos vectores están presentes (Rohoušová y col., 2005a). Las diferencias entre la respuesta de ratones y cricetos inmunizados con plásmidos codificantes de proteínas salivales de *L. longipalpis* son otro ejemplo que apoya esta hipótesis (Gomes y col., 2008).

Existen diferencias notorias en la intensidad del reconocimiento de *spots* identificados como la misma proteína. Estas observaciones sugieren que la presencia de isoformas o modificaciones postraduccionales influyen en la variabilidad antigénica, hecho que debe tomarse en consideración a la hora de elegir el sistema de expresión de proteínas para la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, se necesitan estudios más profundos para evaluar su posible implicación en la inmunogenicidad.

Algunas señales de reconocimiento antígeno-anticuerpo detectadas por *WB* se corresponden con *spots* casi imperceptibles, levemente detectables tras la tinción de los geles, por lo que no pudieron ser analizados por MALDI-TOF/TOF. Esto puede ser debido a que la detección inmunológica presenta mayor sensibilidad que la visualizada por tinción con plata o Coomassie coloidal.

#### 5.4 Análisis de la genoteca de ADNc de las glándulas salivales de *P. perniciosus*

En términos generales, se encontró un elevado grado de **conservación** entre los transcritos salivales de nuestra genoteca y las secuencias anotadas en las bases de datos procedentes de *P. perniciosus* de Italia (Anderson y col., 2006). Estas observaciones a nivel transcriptómico coinciden con los resultados obtenidos a nivel proteico, al comparar la saliva de *P. perniciosus* procedentes de diferentes zonas de España (Apartado 4.1.1). De la misma manera, otros autores encuentran también un elevado grado de conservación entre los transcritos salivales de poblaciones de *P. duboscqi* procedentes de zonas geográficamente alejadas en África y se ha sugerido que los flebotomos pertenecientes al género *Phlebotomus* muestran mayor grado de conservación que *Lutzomyia* spp. (Kato y col., 2006). Más recientemente, la comparación entre los transcritos salivales de *P. papatasi* de Israel y Túnez, y de *P. orientalis* de diferentes zonas de Etiopía ha mostrado altos niveles de conservación (Abdeladhim y col., 2012; Vlková y col., 2014).

Se han descrito dos tendencias evolutivas en las proteínas salivales de los flebotomos. Un grupo de proteínas conservadas, presentes en metazoos e insectos, que está formado por familias como apirinas, proteínas relacionadas con el antígeno 5 y endonucleasas. En esta línea, se ha analizado la evolución de la apirina de *P. ariasi*, en términos de genética de poblaciones, demostrándose una ausencia de selección adaptativa reciente en la secuencia de esta proteína (Mahamdallie y Ready, 2012). El otro grupo de proteínas salivales, que incluye familias de proteínas relacionadas con PpSP15 y PpSP32 de *P. papatasi*, muestra altos niveles de divergencia debido a eventos de duplicación génica (Anderson y col., 2006). Concretamente, PpSP15 de *P. papatasi* y maxadilano de *L. longipalpis* contienen en sus secuencias multitud de polimorfismos (Muller y col., 2004a; El-naem y col., 2005). En el caso de maxadilano, el elevado nivel de polimorfismos en su secuencia promueve la generación de anticuerpos específicos de cada variante, con poca reactividad cruzada, lo que ha dado lugar a pensar que la secuencia de maxadilano puede haber evolucionado como una estrategia de los flebotomos para evadir la respuesta inmune del hospedador frente a este péptido, esencial en la alimentación sanguínea de *L. longipalpis*, al no verse modificada la potencia vasodilatadora en dichas variantes (Lanzaro y col., 1999; Muller y col., 2004a).

A pesar del elevado grado de conservación, en el análisis de la genoteca construida con *P. perniciosus* de Madrid también encontramos diversos **polimorfismos** con los transcritos procedentes de *P. perniciosus* de Italia, que fueron confirmados por

secuenciación de ambas hebras de ADN (Martín-Martín y col., 2013b). La mayoría de los polimorfismos se localizaron en las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR), que son conocidas por su elevada variabilidad y no afectan a la secuencia final de la proteína traducida (Patthy, 2008). Sin embargo, algunos polimorfismos también se situaron en la zona codificante, dando lugar a cambios de aminoácidos. Las sustituciones en regiones codificantes pueden afectar a la estructura de las proteínas y por tanto a la fuerza electrostática y a la afinidad por el ligando que finalmente podrían originar cambios en la función de la proteína (Walsh y col., 2008). A pesar de que los polimorfismos en las proteínas salivales son esperables entre poblaciones de flebotomos, se realizó un análisis detallado de la predicción de los cambios de estructura de las proteínas mediante modelos *in silico* de la localización de las regiones alfa y beta, antigenicidad, sitios de fosforilación y glicosilación de las secuencias de las proteínas codificadas por los genes aislados de la genoteca objeto de estudio y las correspondientes proteínas concordantes en las bases de datos. Los resultados de estos análisis *in silico* confirmaron la presencia de varios cambios potenciales en la estructura e índice antigénico entre las proteínas de nuestra genoteca y las proteínas con mayor similitud en las bases de datos.

En el caso de la predicción de cambios en los residuos aminoacídicos fosforilados, la mayoría de los transcritos analizados presentaron cambios con respecto a *P. perniciosus* de Italia. Un ejemplo de ello es el caso de SP01B, en el que los programas bioinformáticos determinaron una predicción de fosforilación en los aminoácidos T<sup>163</sup> y Y<sup>148</sup> en la secuencia de SP01B de *P. perniciosus* de Italia, no observándose esta predicción en la secuencia de *P. perniciosus* de España.

Las mutaciones puntuales pueden cambiar la capacidad de las proteínas para unirse a los hidratos de carbono, sin embargo no se encontraron variaciones que afectaran a los sitios de N y O-glicosilación mediante la predicción *in silico*.

El hecho de haber detectado polimorfismos entre los transcritos presentes en la genoteca de las glándulas salivales complementa los resultados obtenidos mediante proteómica de la saliva de *P. perniciosus*, ya que algunos *spots* que presentaban diferente movilidad en los geles dieron lugar a la identificación de una única proteína, sugiriendo la existencia de fenómenos de redundancia debidos a la presencia de isoformas. En cuanto a las proteínas salivales secretadas, es posible que la presencia de múltiples copias de los genes reflejen una adaptación para aumentar la producción de estas proteínas, de gran importancia para los flebotomos (Elnaïem y col., 2005). Los péptidos salivales generalmente

son codificados por familias génicas y hay evidencia de solapamiento de funciones (Anderson y col., 2006).

El 67% de los transcritos aislados de la genoteca se corresponden con proteínas de la **superfamilia de proteínas de unión a sustancias olorosas (D7 y proteínas relacionadas con PpSP15)**. Este hallazgo concuerda con los experimentos de electroforesis bidimensional de la saliva de *P. perniciosus*, en los que las proteínas D7/PpSP15 también fueron identificadas como las mayoritarias (Tabla 31). En culícidos, las proteínas D7 son capaces de unir aminas biogénicas, leucotrienos y varios componentes de la cascada de la coagulación, interfiriendo en la respuesta inmune y homeostática (Calvo y col., 2006). El papel que juegan en los flebotomos aún no ha sido esclarecido, sin embargo, su gran representación a nivel transcriptómico y proteómico (Anderson y col., 2006; Abdeladhim y col., 2012; Rohoušová y col., 2012) y la conservación del motivo responsable de la unión a los cisteinil leucotrienos sugieren una importante implicación en la hematofagia (Alvarenga y col., 2010). Concretamente, el sitio de unión para análogos del tromboxano A2 (TXA2) en la proteína D7 de *An. stephensi* (GenBank: 315583502) se encuentra en un bolsillo hidrofóbico en el dominio N-terminal que acomoda gran parte de la cadena de ácidos grasos. La tirosina en la posición 52 en la proteína D7 de *An. stephensi* se sabe que estabiliza los análogos del TXA2 a través de enlaces de hidrógeno (Alvarenga y col., 2010). En la proteína D7 de *Ae. aegypti* (GenBank: AP:3DXL\_A), una mutación de este residuo (fenilalanina en vez de tirosina) conlleva la falta de afinidad y, por tanto, de unión a los análogos de TXA2 (Calvo y col., 2009). En flebotomos, la mayoría de las proteínas relacionadas con D7 conservan una tirosina en esa posición (Y<sup>65</sup>), sin embargo, ambas proteínas SP04 de *P. perniciosus* de España e Italia contienen una fenilalanina. Por otra parte, en la proteína SP04 de *P. perniciosus* de España (GenBank: CCK73754) uno de los motivos de unión a cisteinil leucotrienos ubicado en R<sup>51</sup> mostró un polimorfismo. Sin embargo, sin la confirmación experimental de las funciones de las proteínas relacionadas con D7 en flebotomos, se desconoce la repercusión de los cambios observados en el motivo de unión a cisteinil leucotrienos. Por tanto, se deberían llevar a cabo estudios adicionales para esclarecer si las proteínas D7 en flebotomos son capaces de unirse a los cisteinil leucotrienos y de jugar un papel en la homeostasia.

Las proteínas relacionadas con PpSP15 han sido únicamente descritas en los flebotomos y suponen el grupo mayoritario a nivel transcriptómico de las glándulas salivales (Hostomská y col., 2008; Rohoušová y col., 2012). Existe un elevado nivel de polimorfismos en este grupo de proteínas salivales ya que evolutivamente derivan de una familia génica de múltiples copias (Elnaiem y col., 2005; Anderson y col., 2006). Las secuencias de estas

proteínas muestran un elevado grado de variabilidad, además de algunos residuos de cisteína conservados (Abdeladhim y col., 2012). En *P. papatasi*, existe un gran número de variantes génicas de PpSP15, pero tan sólo algunas de ellas originan sustituciones a nivel aminoacídico (Elnaiem y col., 2005).

Respecto a los transcritos que codifican las **proteínas amarillas**, no existen polimorfismos en los aminoácidos involucrados en la unión de estas proteínas a las aminos biogénicas (Xu y col., 2011).

La mayoría de los transcritos secuenciados en la genoteca de ADNc contienen péptido señal, lo que indica que son proteínas secretadas. También se encontraron algunos transcritos incompletos o codificantes de genes constitutivos, que carecen de dicha señal. En este sentido, el transcrito que codifica la proteína hipotética P119 (GenBank: HE985078) se encontró entre los ADNc secuenciados. Esta proteína, hallada por primera vez en las glándulas salivales de flebotomos, comparte homología con varias proteínas hipotéticas de diferentes insectos, observándose la mayor similitud con una proteína de *Ae. aegypti* (GenBank: XM\_001663068).

## **5.5 Obtención de proteínas recombinantes de la saliva y su evaluación como marcadores de exposición**

La producción de proteínas recombinantes de la saliva para sustituir el extracto salival es necesaria por diversos motivos. A nivel técnico, la obtención de saliva mediante disección de las glándulas supone un trabajo demasiado laborioso como para ser aplicado a mayor escala. Por otro lado, la composición del extracto total de la saliva depende de la edad, según datos publicados por otros autores (Volf y col., 2000; Prates y col., 2008) y los obtenidos en esta Tesis (Apartado 4.1.2). La dieta e incluso variaciones a nivel poblacional e individual también afectan a la composición de la saliva (Prates y col., 2008; Rohoušová y col., 2011b), lo que puede dar lugar a falta de reproducibilidad entre lotes de extractos salivales. Respecto a la especificidad, trabajar con una o varias proteínas recombinantes minimizaría las posibles reacciones cruzadas entre anticuerpos antisaliva de diferentes insectos.

Los componentes de la saliva pueden promover respuestas inmunes diferentes. La saliva está formada por una mezcla de moléculas que incluso pueden producir respuestas alérgicas o inmunosupresión. En *P. papatasi*, se han identificado moléculas que difieren radicalmente en la respuesta inmune que generan en los vertebrados, unas protegen frente a la infección por *L. major* (PpSP15) mientras que otras median en el agravamiento de la

infección (PpSP44) (Oliveira y col., 2008). La respuesta protectora de una proteína salival está relacionada con la inmunidad celular que producen, fundamentalmente mediada por las células T CD4+. Como estas respuestas son altamente dependientes del bagaje inmunogenético de cada hospedador no se debe trabajar con un único candidato, sino buscar una aproximación más amplia que incluya la combinación de varias moléculas que cubran las necesidades a nivel poblacional (Valenzuela y col., 2004).

Una vez identificadas las proteínas antigénicas presentes en la saliva de *P. perniciosus*, algunas de ellas fueron subclonadas, expresadas y purificadas para poder estudiar la capacidad de dichas moléculas como marcadores de exposición a la picadura. Se estudiaron diversas condiciones de expresión, a diferentes concentraciones de IPTG, temperaturas y tiempos de inducción para poder establecer las condiciones más favorables. El reconocimiento de las tres proteínas recombinantes, rSP01B, rSP04 y rSP08, de la saliva de *P. perniciosus* se estudió, mediante ELISA y WB, con sueros de animales experimentalmente inmunizados con la saliva de esta especie. Concretamente, utilizamos los sueros de ratones y perros, como modelos de laboratorio y de exposición natural a las picaduras de *P. perniciosus*, respectivamente (Drahota y col., 2014).

La proteína recombinante **rSP04**, relacionada con D7, no fue reconocida por los sueros de los ratones *skh* ni por los perros expuestos experimentalmente a las picaduras por ninguna de las dos técnicas empleadas, ELISA y WB. Estos resultados concuerdan con los experimentos de detección de antígenos salivales mediante WB, tras la electroforesis bidimensional del extracto salival, ya que las proteínas relacionadas con D7 nativas (SP04 y SP04B) fueron reconocidas por los sueros de cricetos pero no por los sueros de ratones (Apartado 4.8). Sin embargo, algunos de los sueros de los ratones BALB/c, inmunizados mediante la Pauta 3, sí contenían anticuerpos, en niveles muy variables, frente a la proteína recombinante rSP04 (Apartado 4.9). Los ratones de la Pauta 3 fueron expuestos a una dosis mayor y más continuada en el tiempo, lo que podría explicar estas diferencias en el reconocimiento. La variabilidad encontrada en la respuesta inmune de diferentes vertebrados frente a rSP04 apoya los estudios de otros autores en relación al reconocimiento de proteínas D7. Así, únicamente algunos de los perros expuestos de forma natural o experimental a la picadura de *P. perniciosus* reconocieron débilmente las proteínas relacionadas con D7 (Vlková y col., 2011). Debido a esta variabilidad en el reconocimiento, la proteína SP04 no se considera un candidato adecuado como marcador de la exposición a los flebotomos.



Las proteínas recombinantes **rSP01B** y **rSP08** fueron reconocidas por los sueros hiperinmunes de ratones *skh* en ELISA y *WB* y, ambas técnicas, permitieron diferenciar entre animales expuestos y no expuestos a las picaduras de *P. perniciosus* (Apartado 3.2.9). A pesar del bajo número de sueros empleados, los niveles de anticuerpos frente a estas dos proteínas recombinantes se correlacionaron positivamente con los niveles totales de anticuerpos antisaliva. Sin embargo, cuando utilizamos sueros del reservorio doméstico, el perro, observamos una discordancia en los resultados de ambas técnicas serológicas. Únicamente los sueros de los perros reconocieron específicamente las proteínas recombinantes rSP01B y rSP08, mediante *WB*. La discrepancia entre ELISA y *WB* podría deberse a diferencias en los antígenos que exhiben ambas técnicas. Estos resultados apoyan estudios de otros autores, en los que se describe esta misma discordancia en el reconocimiento del extracto salival de *P. sergenti* por parte de sueros de ratones expuestos a sus picaduras, mediante las dos técnicas (Drahota y col., 2009).

Paralelamente y en experimentos adicionales a los plasmados en esta Tesis Doctoral, se evaluaron otras proteínas recombinantes de la saliva de *P. perniciosus* como marcadores de exposición, entre ellas las dos apirinas (rSP01 y rSP01B), la proteína amarilla (rSP03B) y la proteína relacionada con el Ag5 (rSP07), obtenidas y evaluadas en condiciones desnaturalizantes en el LBV (CUNI) (Drahota y col., 2014). Resulta interesante que, utilizando los mismos sueros de perros, se obtuvieron diferentes niveles de anticuerpos frente a la apirina rSP01B, evaluada en su forma desnaturalizada (producida en el LBV, CUNI), y en su forma renaturalizada (producida en la UEM, ISCIII). Contrariamente a los resultados alcanzados con la proteína rSP01B en nuestro laboratorio, los niveles de anticuerpos frente a rSP01B, en forma desnaturalizada, se correlacionaron con los niveles de anticuerpos antisaliva total ( $r=0.91$ ;  $p<0.0001$ ). Esta discordancia entre el reconocimiento de la misma proteína recombinante (rSP01B), mediante ELISA, una evaluada en forma desnaturalizada y la otra sometida a un tratamiento para asemejar su plegamiento original, podría ser fruto de las diferencias en la conformación antigénica de ambas proteínas y de la exposición de epítomos. Esta observación parece poner de manifiesto la importancia de los epítomos lineales, en el caso del reconocimiento por parte de los sueros de perros frente a rSP01B. En ese caso, la proteína rSP01B renaturalizada podría carecer de dichos epítomos lineales. Por otro lado, no podemos descartar la importancia de los epítomos conformacionales, ya que desconocemos el grado de similitud conformacional de nuestras proteínas recombinantes con las nativas. Para ello, se deberían realizar experimentos que demuestren el correcto plegamiento estructural en las proteínas recombinantes producidas, mediante estudios de actividad enzimática o cristalización proteica.

## 5.6 Especificidad de los anticuerpos antisaliva

La especificidad es un requisito primordial en el desarrollo de técnicas basadas en la medida del nivel de los anticuerpos antisaliva y su posterior aplicación en la ecoepidemiología de *Leishmania* spp. Algunos autores han puesto de manifiesto la especificidad de la saliva en garrapatas, simúlidos, culícidos y triatominos (Marshall y col., 1986; Pinnas y col., 1986). Por otro lado, también se ha detectado cierta reactividad cruzada entre los componentes salivales de diferentes especies de artrópodos hematófagos, debida a epítomos compartidos (Wheeler y col., 1991; Cross y col., 1993; Hlatshwayo y col., 2004; Trevejo y col., 2005; Schwarz y col., 2010). En este sentido, un mayor grado de reacciones cruzadas se relaciona con una mayor cercanía evolutiva de los componentes salivales (Trevejo y col., 2005; Fontaine y col., 2011).

La respuesta de anticuerpos antisaliva de flebotomos parece ser más específica que la observada frente a la saliva de otros insectos (Volf y Rohoušová, 2001; Rohoušová y col., 2005a). Diversos autores han destacado una elevada especificidad de las proteínas de la saliva de los flebotomos del Viejo y Nuevo Mundo (Volf y Rohoušová, 2001; Rohoušová y col., 2005a; de Moura y col., 2007; Souza y col., 2010). Estos estudios concuerdan con nuestros resultados, ya que se observó una total ausencia de reacciones cruzadas entre los anticuerpos antisaliva de *P. perniciosus* y *P. argentipes*, en los sueros de cricetos expuestos individualmente a las picaduras de cada una de estas especies (Apartado 4.5.1). Tampoco se observaron reacciones cruzadas entre los anticuerpos antisaliva de *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. sergenti* y *L. longipalpis* presentes en los sueros de ratones inmunizados con la saliva de estas especies de flebotomos (Apartado 4.5.2).

Diversos estudios han evidenciado reacciones cruzadas entre la saliva de varias especies de flebotomo. Los sueros de ratones inmunizados con el extracto salival de *L. intermedia* reconocieron alguna banda proteica de la saliva de *L. longipalpis* (de Moura y col., 2007). De la misma manera, se observa cierta reactividad cruzada entre sueros de humanos de zonas con presencia de *L. intermedia* o de *L. longipalpis*, en Brasil (Souza y col., 2010). En algunas zonas de India, *P. argentipes* y *P. papatasi* coexisten simpátricamente y se ha detectado reactividad cruzada entre la respuesta antisaliva frente a ambas especies. De hecho, se ha desarrollado una técnica de ELISA para discriminar entre la exposición al vector de LV (*P. argentipes*) preadsorbiendo los sueros humanos con antígeno salival de *P. papatasi* (Clements y col., 2010). También se han observado ciertas reacciones cruzadas entre los sueros de humanos naturalmente expuestos a las picaduras de *L. longipalpis* y las proteínas de la saliva de *P. papatasi*. Se piensa que puede deberse a

posibles reacciones inespecíficas con la saliva de otros insectos, ya que los sueros de humanos no expuestos a las picaduras de los flebotomos también reconocen algunas bandas proteicas de la saliva (Barral y col., 2000).

A pesar de que no se encontraron reacciones cruzadas entre los anticuerpos frente a la saliva de las especies de flebotomos estudiadas, no deben descartarse reacciones cruzadas con proteínas de la saliva de otros insectos más alejados evolutivamente, por lo que se requieren más estudios encaminados en esta dirección.

Respecto a los experimentos realizados sobre la especificidad de las proteínas recombinantes (Apartado 4.8), la apirasa rSP01B presenta un patrón adecuado, ya que únicamente es reconocida por los sueros de ratones expuestos a las picaduras de *P. perniciosus* y no por los sueros de ratones expuestos a *P. papatasi*, *P. sergenti* o *L. longipalpis*. Por el contrario, el reconocimiento de la proteína relacionada con D7, rSP04, por los sueros de ratones inmunizados con la saliva de *P. perniciosus* apenas es superior al de los animales no inmunizados, llegando a ser inferior al reconocimiento de los sueros de los animales inmunizados a través de la picadura de *P. sergenti*, constatándose una elevada inespecificidad en dicho reconocimiento.

Por último, observamos una notable reactividad cruzada entre los sueros de los ratones inmunizados con la saliva de *P. perniciosus* y *P. sergenti* en el reconocimiento de la proteína recombinante relacionada con ParSP25 (rSP08). Esta reactividad cruzada no se debe a la presencia de la proteína de fusión rGST ya que, por separado, demostró no ser inmunogénica para estos ratones. En la saliva de *P. sergenti* no se conoce ningún transcrito que codifique proteínas relacionadas con ParSP25 (Rohoušová y col., 2012), por lo que nuestra hipótesis es que la señal detectada se deba a la similitud de epítomos de SP08 con algunas regiones de otras proteínas de *P. sergenti*. Al realizar una búsqueda de esta similitud en las bases de datos, mediante BLASTp de SP08 (GenBank: CCK33662) restringiendo la búsqueda al taxón de *P. sergenti*, se encontraron dos proteínas que comparten con SP08 un 24% de similitud (GenBank: AFI44990 y ABS42953). En cualquier caso, no existe una evidencia confirmada de esta hipótesis, por lo que sería necesario profundizar en estos estudios.

## 5.7 Estudio de la exposición natural de reservorios a las picaduras de *P. perniciosus* en el contexto del brote de leishmaniosis del suroeste de la Comunidad de Madrid

En el contexto del brote de leishmaniosis humana de la CM, se evaluó la exposición a las picaduras de *P. perniciosus* de los animales domésticos (perros) residentes en Fuenlabrada y Leganés y animales silvestres (liebres y conejos) capturados en esa misma zona. Se utilizó la técnica de ELISA *in house* implementada en nuestro laboratorio con el fin de ampliar la información relativa a los reservorios que están interviniendo en dicho brote. Inicialmente, se llevó a cabo una comparación de la técnica de ELISA optimizada en nuestro laboratorio, UEM (ISCIII), con la utilizada en el LBV (CUNI), obteniéndose resultados de correlación elevados.

En la Península Ibérica, la infección por *L. infantum* ha sido descrita en varias especies de carnívoros silvestres y otros animales tales como roedores, caballos, ovejas y cabras (Portús y col., 2002; Fernández-Bellón y col., 2006; Sobrino y col., 2008). Esta información ha suscitado la hipótesis de la existencia de otros ciclos de transmisión independientes del doméstico. Recientemente, la liebre ibérica (*L. granatensis*) ha sido descrita como un reservorio activo en el brote epidémico de leishmaniosis de la CM (Molina y col., 2012) y se prevé la expansión de este leporido en un futuro hacia el norte de Europa (Acevedo y col., 2012). Posteriormente, se ha demostrado que la liebre europea (*L. europaeus*) también es capaz de albergar *L. infantum*. Los porcentajes de presencia del parásito en estas liebres (*L. granatensis* y *L. europaeus*) son muy elevados, de hasta el 43'6%, establecidos mediante la detección de ADN del parásito por PCR en el bazo de liebres de diversas zonas de España (Ruiz-Fons y col., 2013). La prevalencia de la infección mediante técnicas serológicas en liebres capturadas en el área del brote epidémico de leishmaniosis de la CM alcanza valores de hasta el 74'1%, (Moreno y col., 2014). Respecto a los conejos silvestres, en un estudio realizado por otros autores en el sur de España, se detectó ADN de *L. infantum* en tan sólo un conejo, de los 162 estudiados, determinándose de que los conejos eran únicamente hospedadores accidentales de *L. infantum* (Chitimia y col., 2011). Sin embargo, estudios recientes realizados en el brote epidémico de leishmaniosis de la CM están aportando datos que reflejan una situación distinta. Así, se han detectado prevalencias elevadas de la infección por *L. infantum* en conejos capturados en la zona, mediante técnicas serológicas, alcanzándose valores de hasta el 45'7% (Moreno y col., 2014).

Por otro lado, estudios de xenodiagnóstico llevados a cabo en la UEM (ISCIII), han demostrado la capacidad de liebres y conejos silvestres de transmitir *L. infantum* a un vector

competente, *P. perniciosus* procedente de una colonia establecida en el laboratorio (Molina y col., 2012; Jiménez y col., 2014).

Los resultados obtenidos en los estudios realizados demostraron que, tanto los animales domésticos como los silvestres, estuvieron expuestos a las picaduras de *P. perniciosus*. Estos datos representan las primeras determinaciones de niveles de anticuerpos antisaliva en reservorios vertebrados en España (Martín-Martín y col., 2014), y de forma general suponen la detección por primera vez de anticuerpos antisaliva en el suero de **lepóridos silvestres**, por lo que no ha sido posible la comparación con datos previos de exposición de animales. En particular, los resultados indican que todas las liebres y la mayoría de los conejos silvestres (86%) estudiados estuvieron expuestos a las picaduras de *P. perniciosus*. El amplio rango de niveles de anticuerpos antisaliva detectados en los sueros de liebres y conejos sugiere un diferente grado de exposición de los animales a las picaduras.

Aunque se detectaron niveles de anticuerpos antisaliva superiores en liebres que en conejos no se puede concluir que exista una mayor exposición de las liebres a las picaduras de los flebotomos, pues no se puede descartar una diferente afinidad/reactividad del conjugado anti IgG de conejo con las IgG de liebre. Tampoco se puede descartar una diferente antigenicidad de las proteínas salivales para estos dos vertebrados, tal y como se observó en los experimentos de detección de antígenos salivales usando sueros de ambos animales, mediante *WB*, donde la banda de 27 kDa fue exclusivamente reconocida por los sueros de liebres y la banda de 37 kDa por los sueros de conejos (Figura 74). Las liebres y los conejos, a pesar de pertenecer a la misma familia *Leporidae* presentan diferencias notables en su respuesta inmune (Carmo y col., 2006), por lo que podrían responder de una manera distinta a la infección por *Leishmania* spp.

Por otro lado, observaciones derivadas del trabajo con flebotomos colonizados han demostrado que los conejos son una importante fuente de alimentación sanguínea para las especies del subgénero *Larroussius* (Killick-Kendrick y Killick-Kendrick, 1991; Benito-De Martín y col., 1994; Volf y Volfova, 2011). Estos datos han sido confirmados por los elevados porcentajes de alimentación obtenidos en los experimentos de inmunización de conejos a través de la picadura de *P. perniciosus* (Apartado 4.4.2). La productividad, entendida como la relación entre el número de huevos puestos y el número de adultos eclosionados, es mayor cuando se alimentan de sangre de conejos que de otros vertebrados, tales como cricetos, perros o humanos (Benito-De Martín y col., 1994). La combinación de los elevados niveles de anticuerpos antisaliva observados en conejos y la determinación de las

preferencias alimentarias de los flebotomos capturados en la zona (Jiménez y col., 2013), permiten concluir que estos lagomorfos son una importante fuente de alimentación para los flebotomos del área del brote y, por tanto, están contribuyendo al mantenimiento de elevadas densidades de flebotomos en las cercanías de áreas urbanas densamente pobladas donde está teniendo lugar el brote.

Todos estos datos refuerzan la hipótesis sobre la posible implicación de los lepóridos como reservorios activos y la existencia de un ciclo silvestre en este escenario, independiente del doméstico (Molina y col., 2012; Jiménez y col., 2014).

Un dato interesante es que todas las liebres y los conejos fueron capturados durante el invierno. Por tanto, los niveles elevados de anticuerpos antisaliva detectados en el suero de los lepóridos se mantuvieron al menos tres meses, desde finales de octubre del año anterior, final de la temporada de actividad de *P. perniciosus* en la CM (Gálvez y col., 2010a) hasta el momento de la captura (enero-marzo). Es importante conocer durante cuánto tiempo los anticuerpos antisaliva pueden permanecer detectables en el suero de los animales. Existen pocos trabajos en los que se haya evaluado la cinética de los anticuerpos antisaliva y estos se han centrado en ratones, perros y humanos (Vinhas y col., 2007; Hostomská y col., 2008; Clements y col., 2010; Vlková y col., 2011; Vlková y col., 2012). Hasta la fecha, el seguimiento de la respuesta humoral frente a la saliva en conejos expuestos experimentalmente a las picaduras de *P. perniciosus* (Apartado 4.4.2) representa el primer análisis acerca de la cinética de los anticuerpos antisaliva en lepóridos. En estos experimentos, los niveles de anticuerpos permanecieron estables en valores muy elevados, incluso hasta 5 meses después de la última exposición a las picaduras. Estos resultados hacen sospechar que al menos una parte de la respuesta de anticuerpos podría persistir desde el final del periodo de actividad de los flebotomos (octubre) hasta el inicio de la siguiente (mayo), confirmando los hallazgos observados de la elevada respuesta antisaliva en los lepóridos de la zona del brote de la CM capturados durante el invierno. Se hacen necesarios estudios más prolongados sobre la evolución de la respuesta inmune en lepóridos, ya que, en los análisis de la cinética plasmados en esta Tesis no se pudo completar el tiempo estimado del periodo de ausencia de actividad de los flebotomos (7 meses: octubre-mayo).

Las determinaciones sobre la persistencia de los anticuerpos antisaliva son de vital importancia para poder establecer el momento adecuado para evaluar el resultado de las campañas de control vectorial. Por lo tanto, se hace necesario incidir en estos estudios ya que se desconoce la influencia de la pauta de exposición en la posterior cinética de los

anticuerpos antisaliva. Resulta muy complejo extrapolar una pauta de inmunización experimental a la exposición de los vertebrados a los flebotomos en la naturaleza. En los experimentos de inmunización experimental de los conejos, la pauta elegida (exposición a 500 flebotomos semanales) se estableció de acuerdo a las densidades de *P. perniciosus* derivadas de los resultados de los muestreos entomológicos realizados durante el 2012 y 2013, con trampas adhesivas, en la zona del brote de leishmaniosis de la CM (79'5 y 73 *P. perniciosus*/m<sup>2</sup>/noche, respectivamente) (datos no publicados, UEM, ISCIII). Por otro lado, recientes estudios han demostrado que modificaciones en las pautas de exposición a las picaduras conllevan notables diferencias en el efecto protector de la saliva frente a la progresión de la leishmaniosis en un modelo murino (Rohoušová y col., 2011a), por lo que se requieren estudios más exhaustivos sobre la dinámica de los anticuerpos antisaliva con diferentes pautas de inmunización.

A lo largo de 2012, se llevaron a cabo una serie de medidas de control en el suroeste de la CM con el fin de detener la propagación de esta epidemia (Suárez-Rodríguez y col., 2012). Una forma de evaluar la eficacia de las campañas antivectoriales es constatar la reducción de la exposición de los reservorios a las picaduras de los flebotomos, tras comprobar una disminución del nivel de anticuerpos antisaliva. Esta metodología ha sido empleada para mostrar el éxito de campañas de control de mosca tse-tse, triatominos y culícidos (Drame y col., 2010; Schwarz y col., 2011; Brosseau y col., 2012). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los resultados de la exposición de conejos capturados en 2011/2012 en comparación con 2013. Esto puede deberse al bajo número de sueros empleados en esta comparación o al tiempo de evaluación, ya que quizá el periodo transcurrido entre la aplicación de las medidas de control (fundamentalmente verano) y la captura de los animales (siguiente invierno) no fuera suficiente para detectar una caída en los niveles de anticuerpos antisaliva, tal y como sugieren los resultados preliminares de la cinética de anticuerpos antisaliva en conejos expuestos experimentalmente a la picadura de *P. perniciosus* (Apartado 4.4.2).

También se comparó la respuesta de anticuerpos antisaliva en el suero de liebres y conejos silvestres con los niveles de anticuerpos frente a la proteína apirasa rSP01B, obtenida en condiciones desnaturalizantes y sometida a una posterior renaturalización en la UEM (ISCIII). Esta proteína recombinante había mostrado su utilidad como marcador de exposición a la picadura en ratones, pero no en perros, ya que los niveles de anticuerpos frente al extracto salival no se correlacionaban con los anticuerpos frente a esta proteína recombinante en ELISA. No obstante, en el caso de los lepóridos confirmamos una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre los niveles de anticuerpos frente al

extracto salival y la proteína recombinante rSP01B, validándose su utilización como marcador de exposición en dichos animales silvestres. El reconocimiento de esta proteína recombinante por los sueros de liebres y conejos silvestres fue reafirmada por WB. Estos resultados corroboran la diferencia de especificidad de la respuesta inmune frente a la saliva ya observada en los experimentos de identificación de antígenos salivales recogidos en esta Tesis, en la que se destaca la diferente intensidad del reconocimiento de las proteínas salivales por los sueros de ratones y cricetos, además de las observaciones realizadas por otros autores (Rohoušová y col., 2005a). Por otro lado, también se utilizó la proteína amarilla rSP03B en forma desnaturalizada, cedida por el LBV (CUNI), para evaluar la exposición de liebres, conejos y perros a las picaduras de *P. perniciosus* ya que, en experimentos previos, (no recogidos en esta Tesis), había sido reconocida por los sueros de perros expuestos experimentalmente (Drahota y col., 2014). Se trata de una proteína prometedora a utilizar como marcador de exposición ya que muestra buenos resultados con los sueros de liebres, conejos y perros expuestos de forma natural (Apartado 4.10) y con los sueros de ratones y perros expuestos de forma experimental (Drahota y col., 2014).

Los **perros** residentes en la zona del brote de leishmaniosis de la CM presentaron niveles de anticuerpos antisaliva superiores a los de los sueros de perros controles no expuestos, demostrando su exposición a las picaduras de *P. perniciosus*. Aunque otros autores han determinado que los anticuerpos antisaliva pueden persistir en el suero de los perros hasta el siguiente periodo de actividad de los flebotomos (Hostomská y col., 2008), se puede asumir que al menos una parte de los niveles de anticuerpos detectados se deba a una exposición reciente ya que las muestras se recogieron entre mayo y julio. En otros estudios llevados a cabo en Italia con perros naturalmente expuestos a las picaduras de *P. perniciosus*, se observó un incremento de anticuerpos frente a la saliva durante el periodo de actividad de los flebotomos (Vlková y col., 2011).

Como era de esperar, nuestros resultados mostraron niveles menores de anticuerpos antisaliva en perros potencialmente protegidos de las picaduras de vectores (Grupo 1) que en los perros que no estaban tratados con insecticidas tópicos y/o dormían al aire libre (Grupo 2). Estos resultados coinciden con observaciones previas de otros autores en experimentos con perros expuestos naturalmente a la picadura de *P. perniciosus*, en los que los animales tratados con insecticida recibieron un menor número de picaduras que los no tratados, y desarrollaron una leve respuesta de anticuerpos IgG antisaliva (Hostomská y col., 2008; Vlková y col., 2011). El tratamiento con insecticidas es considerado como una de las principales estrategias en el control de la LCan para reducir el riesgo de la infección humana (Alexander y Maroli, 2003). En consecuencia, el seguimiento de los anticuerpos antisaliva en



perros proporcionaría una información muy valiosa sobre la eficacia de los programas de control.

En el estudio de la exposición de reservorios a las picaduras de *P. perniciosus*, en el contexto del brote de leishmaniosis del suroeste de la CM, no se incluyeron los datos de infección de los animales por *L. infantum*. La prevalencia de la LCan en esta zona era demasiado baja, probablemente debido a la eficacia de las medidas adoptadas por los propietarios para proteger a sus perros frente a la picadura, y por tanto no se ha dispuesto de suficientes sueros de perros positivos para *L. infantum* procedentes del brote. Serán necesarios estudios más pormenorizados para establecer una relación clara entre la respuesta antisaliva y la leishmaniosis.

*Conclusiones*

---



## 6 CONCLUSIONES

1. *Phlebotomus perniciosus* salivary proteomic maps were established by two dimensional electrophoresis for the first time. Protein spots observed in the gels matched the protein bands found in the monodimensional profile and were identified as salivary proteins confirming this technology as an interesting tool to improve arthropod saliva knowledge. In addition, proteomic studies highlighted the presence of isoforms or post-translational modifications in the salivary proteins of *Phlebotomus perniciosus*.

2. Hyperimmune sera were obtained from animals experimentally immunized through the bite of uninfected sand flies. The anti-saliva antibody levels depended on the exposure schedule and correlated with the number of sand fly bites. Moreover, anti-saliva antibodies can be detected in sera of mice and rabbits from the fourth and second week after exposure, respectively, and can persist at least twelve and seventeen weeks after the last exposure to *Phlebotomus perniciosus* bites, respectively. Studies on salivary antibody kinetics provide useful information for an accurate application of anti-saliva antibodies as markers of exposure in the field.

3. Mouse, hamster and rabbit sera used in Western blot revealed different immunogenic salivary proteins stressing the specificity of salivary proteins in immune responses of vertebrates.

4. A cDNA library from the salivary glands of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid was successfully constructed. High level of conservancy was found between salivary transcripts of *Phlebotomus perniciosus* from Spain and Italy. In addition, at the protein level, *Phlebotomus perniciosus* of 3 distinct geographical origins in Spain share salivary protein profile. Thus, little antigenic variation is expected among *Phlebotomus perniciosus* populations suggesting that recombinant salivary proteins could be used in different geographic areas where this sand fly species is present.

5. In order to determine the level of exposure of animals to sand fly bites an ELISA technique was developed to detect anti-sand fly saliva antibodies present in sera of vertebrate reservoirs. By using this ELISA test, the recombinant salivary apyrase rSP01B proved to be adequate as marker of exposure to *Phlebotomus perniciosus* in mice, hares and rabbits, but not in dogs, emphasizing different immunogenicity for the immune responses

in several vertebrates. On the other hand, the recombinant D7 protein rSP04 was not suitable as marker of exposure to *Phlebotomus perniciosus* bites.

6. Specificity of anti-saliva antibodies was confirmed among sera of mice exposed to *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti*, *Phlebotomus argentipes* and *Lutzomyia longipalpis* confirming the use of saliva as a specific epidemiological tool. In addition, recombinant salivary apyrase rSP01B showed appropriate specificity features but not the recombinant rSP08 or rSP04. Therefore, more research on sand fly saliva specificity is needed.

7. Our results confirmed the exposure of hares and rabbits to *Phlebotomus perniciosus* bites in the context of the outbreak of human leishmaniasis in Madrid, supporting the involvement of wild leporids as *Leishmania* reservoirs. This is the first report of anti-saliva antibody levels in naturally bitten domestic dogs and wild animals in Spain and can be considered as a valuable starting point for future studies on the efficacy of anti-vectorial control measures.





## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Badei, N.M., Khater, E.I., Daba, S., Shehata, M.G., 2012. Morphometrics and protein profiles of the salivary glands of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* sand flies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **106**, 235-242.
- Abdeladhim, M., Jochim, R.C., Ben Ahmed, M., Zhioua, E., Chelbi, I., Cherni, S., Louzir, H., Ribeiro, J.M., Valenzuela, J.G., 2012. Updating the salivary gland transcriptome of *Phlebotomus papatasi* (Tunisian Strain): the search for sand fly-secreted immunogenic proteins for humans. *PLoS One* **7**, e47347.
- Abi Abdallah, D.S., Pavinski Bitar, A., Oliveira, F., Meneses, C., Park, J.J., Mendez, S., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Marquis, H., 2014. A *Listeria*-based vaccine that secretes the sand fly salivary protein LJM11 confers long-term protection against vector-transmitted *Leishmania major*. *Infect Immun*. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01633-14>.
- Acevedo, P., Melo-Ferreira, J., Real, R., Alves, P.C., 2012. Past, present and future distributions of an Iberian Endemic, *Lepus granatensis*: ecological and evolutionary clues from species distribution models. *PLoS One* **7**, e51529.
- Adler, S., Theodor, O., 1926. The mouthparts, alimentary tract, and salivary apparatus of the female in *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasit* **20**, 109-142.
- Aguado, M., Espinosa, P., Romero-Mate, A., Tardío, J.C., Córdoba, S., Borbujo, J., 2013. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Fuenlabrada, Madrid. *Actas Dermosifiliogr* **104**, 334-342.
- Aguiar-Soares, R.D., Roatt, B.M., Ker, H.G., Moreira, N.D., Mathias, F.A., Cardoso, J.M., Gontijo, N.F., Bruna-Romero, O., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Correa-Oliveira, R., Giunchetti, R.C., Reis, A.B., 2014. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4+ and CD8+) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit Vectors* **7**, 61.
- Ahmed, S.B., Kaabi, B., Chelbi, I., Derbali, M., Cherni, S., Laouini, D., Zhioua, E., 2010. Lack of protection of pre-immunization with saliva of long-term colonized *Phlebotomus papatasi* against experimental challenge with *Leishmania major* and saliva of wild-caught *P. papatasi*. *Am J Trop Med Hyg* **83**, 512-514.
- Akhavan, A.A., 2011. Immune response of great gerbil against *Phlebotomus papatasi* saliva. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, Berlín, Alemania.
- Albert, S., Klaudiny, J., Simuth, J., 1999. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect Biochem Mol Biol* **29**, 427-434.
- Alcover, M.M., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ballart, C., Castillejo, S., Picado, A., Portús, M., Gállego, M., 2012. Application of molecular techniques in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis. *Parasitol Res* **111**, 515-523.
- Alexander, B., Maroli, M., 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* **17**, 1-18.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Ter Horst, R., López-Vélez, R., Moreno, J., 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **21**, 334-359.



- Alvar, J., Cañavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R., Moreno, J., 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* **10**, 298-319.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* **57**, 1-88.
- Alvar, J., Jiménez, M., 1994. Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? *AIDS* **8**, 854.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M.d., the, W.H.O.L.C.T., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **7**, e35671.
- Alvarenga, P.H., Francischetti, I.M., Calvo, E., Sa-Nunes, A., Ribeiro, J.M., Andersen, J.F., 2010. The function and three-dimensional structure of a thromboxane A2/cysteinyl leukotriene-binding protein from the saliva of a mosquito vector of the malaria parasite. *PLoS Biol* **8**, e1000547.
- Alvarenga, P.H., Xu, X., Oliveira, F., Chagas, A.C., Nascimento, C.R., Francischetti, I.M., Juliano, M.A., Juliano, L., Scharfstein, J., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., Andersen, J.F., 2013. Novel family of insect salivary inhibitors blocks contact pathway activation by binding to polyphosphate, heparin, and dextran sulfate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 2759-2770.
- Alves-Silva, J., Ribeiro, J.M., Van Den Abbeele, J., Attardo, G., Hao, Z., Haines, L.R., Soares, M.B., Berriman, M., Aksoy, S., Lehane, M.J., 2010. An insight into the sialome of *Glossina morsitans morsitans*. *BMC Genomics* **11**, 213.
- Ameri, M., Wang, X., Wilkerson, M.J., Kanost, M.R., Broce, A.B., 2008. An immunoglobulin binding protein (antigen 5) of the stable fly (Diptera: Muscidae) salivary gland stimulates bovine immune responses. *J Med Entomol* **45**, 94-101.
- Anderson, J.M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B.J., Reynoso, D., Seitz, A.E., Lawyer, P., Garfield, M., Pham, M., Valenzuela, J.G., 2006. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* **7**, 52.
- Andrade, B.B., de Oliveira, C.I., Brodskyn, C.I., Barral, A., Barral-Netto, M., 2007. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol* **66**, 122-127.
- Anjili, C.O., Mbatia, P.A., Mwangi, R.W., Githure, J.I., Olobo, J.O., Robert, L.L., Koech, D.K., 1995. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Trop* **60**, 97-100.
- Antinori, S., Cascio, A., Parravicini, C., Bianchi, R., Corbellino, M., 2008. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis* **8**, 191-199.
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., Volf, P., 2013. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill* **18**, 20540.
- Aquino, D.M., Caldas, A.J., Miranda, J.C., Silva, A.A., Barral-Netto, M., Barral, A., 2010. Epidemiological study of the association between anti-*Lutzomyia longipalpis* saliva antibodies and development of delayed-type hypersensitivity to *Leishmania* antigen. *Am J Trop Med Hyg* **83**, 825-827.

- Arcà, B., Lombardo, F., Lanfrancotti, A., Spanos, L., Veneri, M., Louis, C., Coluzzi, M., 2002. A cluster of four D7-related genes is expressed in the salivary glands of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* **11**, 47-55.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobás, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A., Pérez, A., Arangúez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F., 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill* **18**, 20546.
- Artemiev, M.M., 1991. A classification of the subfamily Phlebotominae. *Parassitologia* **33 Suppl**, 69-77.
- Assumpcao, T.C., Charneau, S., Santiago, P.B., Francischetti, I.M., Meng, Z., Araujo, C.N., Pham, V.M., Queiroz, R.M., Castro, C.N., Ricart, C.A., Santana, J., Ribeiro, J.M., 2010. Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of *Dipetalogaster maxima*. *J Proteome Res* **10**, 669-679.
- Ayala-Hurtado, F., 1947. Notas sobre leishmaniosis visceral mediterránea. *Rev San Hig Púb* **21**, 832-838.
- Ayllon, T., Diniz, P.P., Breitschwerdt, E.B., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F., Sáinz, A., 2012. Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* **12**, 143-150.
- Bahia, D., Gontijo, N.F., Leon, I.R., Perales, J., Pereira, M.H., Oliveira, G., Correa-Oliveira, R., Reis, A.B., 2007. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol Res* **100**, 449-454.
- Ballart, C., Barón, S., Alcover, M.M., Portús, M., Gállego, M., 2012. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: first finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. *Acta Trop* **122**, 155-159.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gállego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* **24**, 324-330.
- Barbieri, C.L., 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* **28**, 329-337.
- Barón, S.D., Morillas-Márquez, F., Morales-Yuste, M., Díaz-Saez, V., Irigaray, C., Martín-Sánchez, J., 2011. Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology* **138**, 1234-1244.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E.D., Valenzuela, J.G., Charlab, R., Barral-Netto, M., Ribeiro, J.M., 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* **62**, 740-745.
- Barros, V.C., Oliveira, J.S., Melo, M.N., Gontijo, N.F., 2006. *Leishmania amazonensis*: chemotactic and osmotactic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut. *Exp Parasitol* **112**, 152-157.
- Bates, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* **37**, 1097-1106.
- Bates, P.A., Rogers, M.E., 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med* **4**, 601-609.

- Beach, R., Kiilu, G., Hendricks, L., Oster, C., Leeuwenburg, J., 1984. Cutaneous leishmaniasis in Kenya: transmission of *Leishmania major* to man by the bite of a naturally infected *Phlebotomus duboscqi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **78**, 747-751.
- Beach, R., Kiilu, G., Leeuwenburg, J., 1985. Modification of sand fly biting behavior by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. *Am J Trop Med Hyg* **34**, 278-282.
- Beati, L., Caceres, A.G., Lee, J.A., Munstermann, L.E., 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* **34**, 225-234.
- BECM, Disponible en:  
[http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1265618561630&language=es&pagename=PortalSalud%2FPagina%2FPTSA\\_servicioPrincipal&vest=1156329914017#](http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1265618561630&language=es&pagename=PortalSalud%2FPagina%2FPTSA_servicioPrincipal&vest=1156329914017#). *Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid*.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., Sacks, D.L., 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* **188**, 1941-1953.
- Belkaid, Y., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Rowton, E., Sacks, D.L., Ribeiro, J.M., 2000. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6704-6709.
- Bell, J.F., Stewart, S.J., Wikel, S.K., 1979. Resistance to tick-borne *Francisella tularensis* by tick-sensitized rabbits: allergic klendusity. *Am J Trop Med Hyg* **28**, 876-880.
- Ben Hadj Ahmed, S., Chelbi, I., Kaabi, B., Cherni, S., Derbali, M., Zhioua, E., 2010. Differences in the salivary effects of wild-caught versus colonized *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) on the development of zoonotic cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *J Med Entomol* **47**, 74-79.
- Ben Hadj Ahmed, S., Kaabi, B., Chelbi, I., Cherni, S., Derbali, M., Laouini, D., Zhioua, E., 2011. Colonization of *Phlebotomus papatasi* changes the effect of pre-immunization with saliva from lack of protection towards protection against experimental challenge with *Leishmania major* and saliva. *Parasit Vectors* **4**, 126.
- Benito-De Martín, M.I., Gracia-Salinas, M.J., Molina-Moreno, R., Ferrer-Dufol, M., Lucientes-Curdi, J., 1994. Influence de la nature du sang ingere sur les parametres gonotrophiques de *Phlebotomus perniciosus* sous conditions de laboratoire. *Parasite* **1**, 409-411.
- Benkova, I., Volf, P., 2007. Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* **44**, 150-154.
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., Dunan, S., 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* **55**, 273-277.
- Bonanni, P., 1691. Observationes circa viventia, quae in rebus non viventibus reperiuntur. Cum Micrographia curiosa. Typis Dominici Antonij Herculi: Rome.
- Borovsky, D., Schlein, Y., 1987. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol* **1**, 235-242.

- Botet-Fregola, J., Portús-Vinyeta, M., 1993. La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórica-bibliográfica (1912-1985). *Rev San Hig Púb* **67**, 255-266.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bray, D.P., Bandi, K.K., Brazil, R.P., Oliveira, A.G., Hamilton, J.G., 2009. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. *J Med Entomol* **46**, 428-434.
- Bray, D.P., Hamilton, J.G., 2007. Courtship behaviour in the sandfly *Lutzomyia longipalpis*, the New World vector of visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* **21**, 332-338.
- Brodie, T.M., Smith, M.C., Morris, R.V., Titus, R.G., 2007. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun* **75**, 2359-2365.
- Brosseau, L., Drame, P.M., Besnard, P., Toto, J.-C., Foumane, V., Le Mire, J., Mouchet, F., Remoue, F., Allan, R., Fortes, F., Carnevale, P., Manguin, S., 2012. Human antibody response to *Anopheles* saliva for comparing the efficacy of three malaria vector control methods in Balombo, Angola. *PLoS One* **7**, e44189.
- Bussacos, A.C., Nakayasu, E.S., Hecht, M.M., Assumpcao, T.C., Parente, J.A., Soares, C.M., Santana, J.M., Almeida, I.C., Teixeira, A.R., 2011. Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals. *J Proteomics* **74**, 1693-1700.
- Caljon, G., Broos, K., De Goeyse, I., De Ridder, K., Sternberg, J.M., Coosemans, M., De Baetselier, P., Guisez, Y., Den Abbeele, J.V., 2009. Identification of a functional Antigen5-related allergen in the saliva of a blood feeding insect, the tsetse fly. *Insect Biochem Mol Biol* **39**, 332-341.
- Calvo, E., Mans, B.J., Andersen, J.F., Ribeiro, J.M., 2006. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biol Chem* **281**, 1935-1942.
- Calvo, E., Mans, B.J., Ribeiro, J.M., Andersen, J.F., 2009. Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3728-3733.
- Calvo, E., Ribeiro, J.M., 2006. A novel secreted endonuclease from *Culex quinquefasciatus* salivary glands. *J Exp Biol* **209**, 2651-2659.
- Cardoso, L., Lopes, A.P., Sherry, K., Schallig, H., Solano-Gállego, L., 2010. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet Parasitol* **174**, 37-42.
- Carmo, C.R., Esteves, P.J., Ferrand, N., van der Loo, W., 2006. Genetic variation at chemokine receptor CCR5 in leporids: alteration at the 2nd extracellular domain by gene conversion with CCR2 in *Oryctolagus*, but not in *Sylvilagus* and *Lepus* species. *Immunogenetics* **58**, 494-501.
- Cavalcante, R.R., Pereira, M.H., Freitas, J.M., Gontijo Nde, F., 2006. Ingestion of saliva during carbohydrate feeding by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**, 85-87.
- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* **73**, 203-266.
- Cerna, P., Mikes, L., Volf, P., 2002. Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae). *Insect Biochem Mol Biol* **32**, 1691-1697.

- Chagas, A.C., Oliveira, F., Debrabant, A., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., Calvo, E., 2014. Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases *Leishmania* Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits Xlla Contact Activation in Human Plasma. *PLoS Pathog* **10**, e1003923.
- Champagne, D.E., Ribeiro, J.M., 1994. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 138-142.
- Charlab, R., Ribeiro, J.M., 1993. Cytostatic effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenates on *Leishmania* parasites. *Am J Trop Med Hyg* **48**, 831-838.
- Charlab, R., Rowton, E.D., Ribeiro, J.M., 2000. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp Parasitol* **95**, 45-53.
- Charlab, R., Tesh, R.B., Rowton, E.D., Ribeiro, J.M., 1995. *Leishmania amazonensis*: sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary gland homogenates of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp Parasitol* **80**, 167-175.
- Charlab, R., Valenzuela, J.G., Rowton, E.D., Ribeiro, J.M., 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15155-15160.
- Charneau, S., Junqueira, M., Costa, C.M., Pires, D.L., Fernandes, E.S., Bussacos, A.C., V. Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., Shevchenko, A., Teixeira, A.R.L., 2007. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. *Int J Mass Spec* **268**, 265-276.
- Chelbi, I., Zhioua, E., 2007. Biology of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Entomol* **44**, 597-600.
- Chen, H.Q., Yao, Q., Bao, F., Chen, K.P., Liu, X.Y., Li, J., Wang, L., 2011. Comparative Proteome Analysis of Silkworm in Its Susceptibility and Resistance Responses to *Bombyx mori* Densonucleosis Virus. *Intervirology*. <http://dx.doi.org/10.1159/000322381>.
- Chicharro, C., Llanes-Acevedo, I., García, E., Nieto, J., Moreno, J., Cruz, I., 2013. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill* **18**, 20545.
- Chitimia, L., Muñoz-García, C.I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., Del Río, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Giménez-Font, P., Jiménez-Montalban, P., Martínez-Ramírez, A., Meseguer-Meseguer, J.M., García-Bacete, I., Sánchez-Isarría, M.A., Sanchís-Monsonís, G., García-Martínez, J.D., Vicente, V., Segovia, M., Berriatua, E., 2011. Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet Parasitol* **181**, 12-16.
- Choumet, V., Carmi-Leroy, A., Laurent, C., Lenormand, P., Rousselle, J.C., Namane, A., Roth, C., Brey, P.T., 2007. The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. *Proteomics* **7**, 3384-3394.
- Christophers, S.R., Shortt, H.E., Barraud, P.J., 1925. The development of the parasite of indian kala-azar in the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti. *Indian J Med Res* **12**, 605-607.
- Claborn, D.M., 2010. The biology and control of leishmaniasis vectors. *J Glob Infect Dis* **2**, 127-134.
- Clements, M.F., Gidwani, K., Kumar, R., Hostomska, J., Dinesh, D.S., Kumar, V., Das, P., Muller, I., Hamilton, G., Volfova, V., Boelaert, M., Das, M., Rijal, S., Picado, A., Volf, P., Sundar, S., Davies, C.R., Rogers, M.E., 2010. Measurement of recent exposure to *Phlebotomus*

- argentipes*, the vector of indian visceral leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am J Trop Med Hyg* **82**, 801-807.
- Coelho, W.M., Bresciani, K.D., 2013. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in a dipteran of the species *Tabanus importunus*. *Rev Bras Parasitol Vet* **22**, 605-607.
- Colombo, F.A., Odorizzi, R.M., Laurenti, M.D., Galati, E.A., Canavez, F., Pereira-Chiocola, V.L., 2011. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res* **109**, 267-274.
- Collin, N., Assumpcao, T.C., Mizurini, D.M., Gilmore, D.C., Dutra-Oliveira, A., Kotsyfakis, M., Sa-Nunes, A., Teixeira, C., Ribeiro, J.M., Monteiro, R.Q., Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M., 2012. Lufaxin, a novel factor Xa inhibitor from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* blocks protease-activated receptor 2 activation and inhibits inflammation and thrombosis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 2185-2198.
- Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Cheng, L., Laughinghouse, A., Ward, J.M., Elnaïem, D.E., Fischer, L., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2009. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathog* **5**, e1000441.
- Conesa-Gállego, E., Romera-Lozano, H., Martínez-Ortega, E., 1999. Estudio de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Comunidad de Madrid (España). *Anales de Biología* **22**, 43-50.
- Costa, C.M., Sousa, M.V., Ricart, C.A., Santana, J.M., Teixeira, A.R., Roepstorff, P., Charneau, S., 2011. 2-DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*. *J Proteomics* **74**, 1652-1663.
- Costa, D.J., Favali, C., Clarencio, J., Afonso, L., Conceicao, V., Miranda, J.C., Titus, R.G., Valenzuela, J., Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C.I., 2004. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun* **72**, 1298-1305.
- Courtenay, O., Quinnell, R.J., Garcez, L.M., Shaw, J.J., Dye, C., 2002. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* **186**, 1314-1320.
- Coutinho-Abreu, I.V., Mukbel, R., Hanafi, H.A., Fawaz, E.Y., El-Hossary, S.S., Wadsworth, M., Stayback, G., Pitts, D.A., Abo-Shehada, M., Hoel, D.F., Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., McDowell, M.A., 2011. Expression plasticity of *Phlebotomus papatasi* salivary gland genes in distinct ecotopes through the sand fly season. *BMC Ecol* **11**, 24.
- Coutinho-Abreu, I.V., Ramalho-Ortigao, M., 2011. Ecological genomics of sand fly salivary gland genes: an overview. *J Vector Ecol* **36 Suppl 1**, S58-63.
- Coutinho-Abreu, I.V., Wadsworth, M., Stayback, G., Ramalho-Ortigao, M., McDowell, M.A., 2010. Differential expression of salivary gland genes in the female sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* **47**, 1146-1155.
- Coutinho, M.T., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., De Maria, M., Genaro, O., Linardi, P.M., 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* **128**, 149-155.
- Criado-Fornelio, A., Gutiérrez-García, L., Rodríguez-Caabeiro, F., Reus-García, E., Roldán-Soriano, M.A., Díaz-Sánchez, M.A., 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet Parasitol* **92**, 245-251.

- Cross, M.L., Cupp, M.S., Cupp, E.W., Ramberg, F.B., Enríquez, F.J., 1993. Antibody responses of BALB/c mice to salivary antigens of hematophagous black flies (Diptera: *Simuliidae*). *J Med Entomol* **30**, 725-734.
- Cruz, I., Morales, M.A., Noguer, I., Rodríguez, A., Alvar, J., 2002. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* **359**, 1124-1125.
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Cañavate, C., Desjeux, P., Alvar, J., 2006. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* **123**, 357-388.
- da Silva, R.A., Tavares, N.M., Costa, D., Pitombo, M., Barbosa, L., Fukutani, K., Miranda, J.C., de Oliveira, C.I., Valenzuela, J.G., Barral, A., Soto, M., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., 2011. DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. *Acta Trop* **120**, 185-190.
- da Silva, S.M., Rabelo, P.F., Gontijo Nde, F., Ribeiro, R.R., Melo, M.N., Ribeiro, V.M., Michalick, M.S., 2010. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet Parasitol* **174**, 150-154.
- de Almeida, M.C., 2002. Infective inoculum for *Leishmania*. *Trends Parasitol* **18**, 154-155.
- de Moura, T.R., Oliveira, F., Carneiro, M.W., Miranda, J.C., Clarencio, J., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., Barral, A., Ribeiro, J.M., Valenzuela, J.G., de Oliveira, C.I., 2013. Functional transcriptomics of wild-caught *Lutzomyia intermedia* salivary glands: identification of a protective salivary protein against *Leishmania braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2242.
- de Moura, T.R., Oliveira, F., Novais, F.O., Miranda, J.C., Clarencio, J., Follador, I., Carvalho, E.M., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., 2007. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *PLoS Negl Trop Dis* **1**, e84.
- de Moura, T.R., Oliveira, F., Rodrigues, G.C., Carneiro, M.W., Fukutani, K.F., Novais, F.O., Miranda, J.C., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., Barral, A., de Oliveira, C.I., 2010. Immunity to *Lutzomyia intermedia* Saliva Modulates the Inflammatory Environment Induced by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e712.
- Del Río, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De la Rua, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Muñoz-García, C.I., Goyena, E., García-Martínez, D., Fisa, R., Riera, C., Murcia, L., Segovia, M., Berriatua, E., 2013. Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Prev Vet Med* **113**, 430-435.
- Díaz-Sáez, V., Merino-Espinosa, G., Morales-Yuste, M., Corpas-López, V., Pratlong, F., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2014. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: Epidemiological consequences. *Vet Parasitol*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.1003.1029>.
- Donnelly, K.B., Lima, H.C., Titus, R.G., 1998. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *J Parasitol* **84**, 97-103.
- Donovan, C., 1903. Memoranda: On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J*, 79.
- Dostalova, A., Volf, P., 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors* **5**, 276.

- Dougall, A.M., Alexander, B., Holt, D.C., Harris, T., Sultan, A.H., Bates, P.A., Rose, K., Walton, S.F., 2011. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol* **41**, 571-579.
- Dougherty, M.J., Hamilton, J.G., Ward, R.D., 1993. Semiochemical mediation of oviposition by the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Med Vet Entomol* **7**, 219-224.
- Dougherty, M.J., Hamilton, J.G., Ward, R.D., 1994. Isolation of oviposition pheromone from the eggs of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Med Vet Entomol* **8**, 119-124.
- Dougherty, M.J., Hamilton, J.G.C., 1996. A biologically-active compound from pupae of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) and its possible role in defence. *Bull Entomol Res* **86**, 11-16.
- Drahota, J., Lipoldova, M., Volf, P., Rohousova, I., 2009. Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. *Parasite Immunol* **31**, 766-770.
- Drahota, J., Martín-Martín, I., Sumová, P., Rohoušová, I., Jiménez, M., Molina, R., Volf, P., 2014. Recombinant antigens from *Phlebotomus perniciosus* saliva as markers of canine exposure to visceral leishmaniasis vector. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2597.
- Drame, P.M., Poinsignon, A., Besnard, P., Cornelie, S., Le Mire, J., Toto, J.C., Foumane, V., Dos-Santos, M.A., Sembene, M., Fortes, F., Simondon, F., Carnevale, P., Remoue, F., 2011. Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. *PLoS One* **5**, e15596.
- Drame, P.M., Poinsignon, A., Besnard, P., Le Mire, J., Dos-Santos, M.A., Sow, C.S., Cornelie, S., Foumane, V., Toto, J.C., Sembene, M., Boulanger, D., Simondon, F., Fortes, F., Carnevale, P., Remoue, F., 2010. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immunoparasitological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control. *Am J Trop Med Hyg* **83**, 115-121.
- Dvorak, V., Halada, P., Hlavackova, K., Dokianakis, E., Antoniou, M., Volf, P., 2014. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasit Vectors* **7**, 21.
- el-Kammah, K.M., 1973. Studies of autogeny in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* **10**, 261-263.
- Elnaiem, D.E., Meneses, C., Slotman, M., Lanzaro, G.C., 2005. Genetic variation in the sand fly salivary protein, SP-15, a potential vaccine candidate against *Leishmania major*. *Insect Mol Biol* **14**, 145-150.
- Fang, J., Han, Q., Li, J., 2002. Isolation, characterization, and functional expression of kynurenine aminotransferase cDNA from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **32**, 943-950.
- Fausto, A.M., Feliciangeli, M.D., Maroli, M., Mazzini, M., 2001. Ootaxonomic investigation of five *Lutzomyia* species (Diptera, Psychodidae) from Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**, 197-204.
- Feliciangeli, M.D., 2006. Sobre los flebotomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), con especial referencia a las especies conocidas en Venezuela. *Acta Biol Venez* **26**, 61-80.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gállego, L., Bardagi, M., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., 2006. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol* **135**, 181-185.



- Fernández, M.S., Salomón, O.D., Cavia, R., Pérez, A.A., Acardi, S.A., Guccione, J.D., 2010. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Trop* **114**, 81-87.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrio, J., Gállego, J., Portus, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* **83**, 87-97.
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Misse, D., Pages, F., Fusai, T., Rogier, C., Almeras, L., 2011. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit Vectors* **4**, 187.
- Francischetti, I.M., My Pham, V., Mans, B.J., Andersen, J.F., Mather, T.N., Lane, R.S., Ribeiro, J.M., 2005. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol* **35**, 1142-1161.
- Freitas, R.A., Naiff, R.D., Barrett, T.V., 2002. Species diversity and flagellate infections in the sand fly fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae. Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**, 53-59.
- Galati, E.A.B., 2003. Morfología e Taxonomía. En: Rangel, E. F. & R. Lainson (eds.), *Flebotomíneos de Brasil*. . *Fiocruz, Rio de Janeiro*, 15-206.
- Gálvez, R., Descalzo, M.A., Miró, G., Jiménez, M.I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E., Molina, R., 2010a. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop* **115**, 95-102.
- Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M.A., Nieto, J., Dado, D., Martín, O., Cubero, E., Molina, R., 2010b. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol* **169**, 327-334.
- García, E.S., Mello, C.B., Azambuja, P., Ribeiro, J.M., 1994. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp Parasitol* **78**, 287-293.
- García, N., Moreno, I., Alvarez, J., de la Cruz, M.L., Navarro, A., Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Rodríguez-Bertos, A., Conty, M.L., Toraño, A., Prieto, A., Domínguez, L., Domínguez, M., 2014. Evidence of *Leishmania infantum* Infection in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a Natural Area in Madrid, Spain. *Biomed Res Int* **2014**, 318254.
- Gaskin, A.A., Schantz, P., Jackson, J., Birkenheuer, A., Tomlinson, L., Gramiccia, M., Levy, M., Steurer, F., Kollmar, E., Hegarty, B.C., Ahn, A., Breitschwerdt, E.B., 2002. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J Vet Intern Med* **16**, 34-44.
- Geraci, N.S., Mukbel, R.M., Kemp, M.T., Wadsworth, M.N., Lesho, E., Stayback, G.M., Champion, M.M., Bernard, M.A., Abo-Shehadeh, M., Coutinho-Abreu, I.V., Ramalho-Ortigao, M., Hanafi, H.A., Fawaz, E.Y., El-Hossary, S.S., Wortmann, G., Hoel, D.F., McDowell, M.A., 2014. Profiling of Human Acquired Immunity Against the Salivary Proteins of *Phlebotomus papatasi* Reveals Clusters of Differential Immunoreactivity. *Am J Trop Med Hyg*, <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.4213-0130>.
- Geyer, P.K., Spana, C., Corces, V.G., 1986. On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the yellow locus of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* **5**, 2657-2662.
- Ghosh, K.N., Mukhopadhyay, J., 1998. The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol* **28**, 275-281.

- Gibson, G., 2008. The environmental contribution to gene expression profiles. *Nat Rev Genet* **9**, 575-581.
- Gidwani, K., Picado, A., Rijal, S., Singh, S.P., Roy, L., Volfova, V., Andersen, E.W., Uranw, S., Ostyn, B., Sudarshan, M., Chakravarty, J., Volf, P., Sundar, S., Boelaert, M., Rogers, M.E., 2011. Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: a cluster-randomized trial. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1296.
- Gil-Collado, J., Morillas-Márquez, F., Sanchís-Marín, M.C., 1989. Flebotomos en España. *Rev Sanid Hig Publica* **63**, 15-34.
- Gil-Prieto, R., Walter, S., Alvar, J., de Miguel, A.G., 2011. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008). *Am J Trop Med Hyg* **85**, 820-825.
- Gillespie, R.D., Mbow, M.L., Titus, R.G., 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* **22**, 319-331.
- Giunchetti, R.C., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B.M., de Oliveira Aguiar-Soares, R.D., Coura-Vital, W., de Abreu, R.T., Malaquias, L.C., Gontijo, N.F., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., Costa, D.J., de Lana, M., Reis, A.B., 2008. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine* **26**, 623-638.
- Gomes, R., Oliveira, F., 2012. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *leishmania* immunity. *Front Immunol* **3**, 110.
- Gomes, R., Oliveira, F., Teixeira, C., Meneses, C., Gilmore, D.C., Elnaiem, D.E., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2012. Immunity to Sand Fly Salivary Protein LJM11 Modulates Host Response to Vector-Transmitted *Leishmania* Conferring Ulcer-Free Protection. *J Invest Dermatol* **132**, 2735-2743.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M.J., Oliveira, F., Menezes, M.J., Silva, C., de Oliveira, C.I., Miranda, J.C., Elnaiem, D.E., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Brodskyn, C.I., 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7845-7850.
- Gomes, R.B., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., Costa, J., Miranda, J.C., Caldas, A., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., Barral, A., 2002. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* **186**, 1530-1534.
- Gomes, R.B., Mendonca, I.L., Silva, V.C., Ruas, J., Silva, M.B., Cruz, M.S., Barral, A., Costa, C.H., 2007. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **101**, 127-133.
- Gossage, S.M., Rogers, M.E., Bates, P.A., 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* **33**, 1027-1034.
- Grimstad, P.R., Ross, Q.E., Craig, G.B., Jr., 1980. *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse virus. II. Modification of mosquito feeding behavior by virus infection. *J Med Entomol* **17**, 1-7.
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribañez, M.A., Alvar, J., Castillo, J.A., 2000. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Sci* **69**, 249-253.

- Guilvard, E., Rioux, J.A., Jarry, D., Moreno, G., 1985. Accouplements successifs chez *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann Parasitol Hum Comp* **60**, 503.
- Guy, M.W., Killick-Kendrick, R., Gill, G.S., Rioux, J.A., Bray, R.S., 1984. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cevennes by bloodmeal analyses. *Ann Parasitol Hum Comp* **59**, 449-458.
- Hamarsheh, O., 2011. Distribution of *Leishmania major* zymodemes in relation to populations of *Phlebotomus papatasi* sand flies. *Parasit Vectors* **4**, 9.
- Hamasaki, R., Kato, H., Terayama, Y., Iwata, H., Valenzuela, J.G., 2009. Functional characterization of a salivary apyrase from the sand fly, *Phlebotomus duboscqi*, a vector of *Leishmania major*. *J Insect Physiol* **55**, 1044-1049.
- Hamilton, J.G., Ramsoondar, T.M., 1994. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. *Med Vet Entomol* **8**, 375-380.
- Hamilton, J.G., Ward, R.D., Dougherty, M.J., Maignon, R., Ponce, C., Ponce, E., Noyes, H., Zeledon, R., 1996. Comparison of the sex-pheromone components of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) from areas of visceral and atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras and Cost Rica. *Ann Trop Med Parasitol* **90**, 533-541.
- Han, Q., Fang, J., Ding, H., Johnson, J.K., Christensen, B.M., Li, J., 2002. Identification of *Drosophila melanogaster* yellow-f and yellow-f2 proteins as dopachrome-conversion enzymes. *Biochem J* **368**, 333-340.
- Handman, E., Bullen, D.V., 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* **18**, 332-334.
- Hasko, G., Cronstein, B.N., 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* **25**, 33-39.
- Hlatshwayo, M., Szabo, M.J., Bechara, G.H., Mbat, P.A., 2004. Cross-reactivity between antigens from *Amblyomma cajennense* and *A. hebraeum* (Acari: Ixodidae). *J S Afr Vet Assoc* **75**, 40-42.
- Hlavacová, J., Votýpka, J., Volf, P., 2013. The Effect of Temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Development in Sand Flies. *J Med Entomol* **50**, 1-4.
- Hodgins-Davis, A., Townsend, J.P., 2009. Evolving gene expression: from G to E to GxE. *Trends Ecol Evol* **24**, 649-658.
- Hostomská, J., Rohoušová, I., Volf, P., Stanneck, D., Mencke, N., Volf, P., 2008. Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne Zoonotic Dis* **8**, 443-450.
- Hostomská, J., Volf, P., Mu, J., Garfield, M., Rohoušová, I., Volf, P., Valenzuela, J.G., Jochim, R.C., 2009. Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. *BMC Genomics* **10**, 282.
- Ilg, T., 2000. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol Today* **16**, 489-497.
- Ingonga, P., Mbat, P.A., Anjili, C.O., Mutani, A., Wishitemi, B., Odongo, S., Robert, L.L., Githure, J.I., 1996. The effect of immune sera from hamsters immunized with sandfly gut and whole body extract antigens on the fecundity and mortality of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *Acta Trop* **60**, 269-279.

- Isawa, H., Orito, Y., Iwanaga, S., Jingushi, N., Morita, A., Chinzei, Y., Yuda, M., 2007. Identification and characterization of a new kallikrein-kinin system inhibitor from the salivary glands of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Insect Biochem Mol Biol* **37**, 466-477.
- Jacobson, R.L., Studentsky, L., Schlein, Y., 2007. Glycolytic and chitinolytic activities of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) from diverse ecological habitats. *Folia Parasitol (Praha)* **54**, 301-309.
- James, A.A., Blackmer, K., Marinotti, O., Ghosn, C.R., Racioppi, J.V., 1991. Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*. *Mol Biochem Parasitol* **44**, 245-253.
- Jefferies, D., Livesey, J.L., Molyneux, D.H., 1986. Fluid mechanics of bloodmeal uptake by *Leishmania*-infected sandflies. *Acta Trop* **43**, 43-53.
- Jiménez, M., Alvar, J., Tibayrenc, M., 1997. *Leishmania infantum* is clonal in AIDS patients too: epidemiological implications. *AIDS* **11**, 569-573.
- Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fuster, F., Molina, R., 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res* **112**, 2453-2459.
- Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R., 2014. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.1003.1027>.
- Jiménez, M.I., Laguna, F., de la Torre, F., Solís, F., Pratlong, F., Alvar, J., 1995. New *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV in Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**, 33.
- Jobling, B., 1978. Anatomical drawings of biting flies. *British Museum (Natural History) and Wellcome Trust*, Londres.
- Jochim, R.C., Teixeira, C.R., Laughinghouse, A., Mu, J., Oliveira, F., Gomes, R.B., Elnaïem, D.E., Valenzuela, J.G., 2008. The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum* *chagasi*-infected sand flies. *BMC Genomics* **9**, 15.
- Jones, L.D., Nuttall, P.A., 1990. The effect of host resistance to tick infestation on the transmission of *Thogoto* virus by ticks. *J Gen Virol* **71** 1039-1043.
- Kaburi, J.C., Ngumbi, P.M., Anjili, C.O., 2011. Sandfly-saliva injected during repeated feeding on a sensitized hamster causes fecundity and mortality to female *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *J Vector Borne Dis* **48**, 61-63.
- Kalume, D.E., Okulate, M., Zhong, J., Reddy, R., Suresh, S., Deshpande, N., Kumar, N., Pandey, A., 2005. A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. *Proteomics* **5**, 3765-3777.
- Kamhawi, S., 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* **22**, 439-445.
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., Sacks, D., 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* **290**, 1351-1354.

- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V.M., Kumar, S., Lawyer, P.G., Turco, S.J., Barillas-Mury, C., Sacks, D.L., Valenzuela, J.G., 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* **119**, 329-341.
- Kato, H., Anderson, J.M., Kamhawi, S., Oliveira, F., Lawyer, P.G., Pham, V.M., Sangare, C.S., Samake, S., Sissoko, I., Garfield, M., Sigutova, L., Volf, P., Doumbia, S., Valenzuela, J.G., 2006. High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya). *BMC Genomics* **7**, 226.
- Kato, H., Gómez, E.A., Cáceres, A.G., Uezato, H., Mimori, T., Hashiguchi, Y., 2010. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *Int J Environ Res Public Health* **7**, 814-826.
- Kato, H., Jochim, R.C., Gomez, E.A., Uezato, H., Mimori, T., Korenaga, M., Sakurai, T., Katakura, K., Valenzuela, J.G., Hashiguchi, Y., 2012. Analysis of salivary gland transcripts of the sand fly *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis. *Infect Genet Evol* **13C**, 56-66.
- Kato, H., Jochim, R.C., Lawyer, P.G., Valenzuela, J.G., 2007. Identification and characterization of a salivary adenosine deaminase from the sand fly *Phlebotomus duboscqi*, the vector of *Leishmania major* in sub-Saharan Africa. *J Exp Biol* **210**, 733-740.
- Katz, O., Waitumbi, J.N., Zer, R., Warburg, A., 2000. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am J Trop Med Hyg* **62**, 145-150.
- Killick-Kendrick, M., Killick-Kendrick, R., 1991. The initial establishment of sandfly colonies. *Parassitologia* **33** 315-320.
- Killick-Kendrick, R., 1983a. Investigation of phlebotomine sandflies-vectors of leishmaniasis. Proceedings of the Indo-UK Workshop on Leishmaniasis, pp. 72-83.
- Killick-Kendrick, R., 1983b. Investigation of phlebotomine sandflies - vectors of leishmaniasis. Proceedings of the Indo-UK Workshop on Leishmaniasis, Rajendra Memorial Research Institute, Patna, India, December 6-10, 1982, pp. 72-83.
- Killick-Kendrick, R., 1990a. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp* **65 Suppl 1**, 37-42.
- Killick-Kendrick, R., 1990b. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* **4**, 1-24.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* **17**, 279-289.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., 1987. Honeydew of aphids as a source of sugar for *Phlebotomus ariasi*. *Med Vet Entomol* **1**, 297-302.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Tang, Y., Bastien, P., 1996. Metacyclic promastigotes of *Leishmania* in the salivary glands of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite* **3**, 55-60.
- Killick-Kendrick, R., Leaney, A.J., Ready, P.D., Molyneux, D.H., 1977. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **196**, 105-115.

- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., 1991. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann Parasitol Hum Comp* **66**, 71-74.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Bailly, M., Guy, M.W., Wilkes, T.J., Guy, F.M., Davidson, I., Knechtli, R., Ward, R.D., Guilvard, E., 1984a. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cevennes. *Ann Parasitol Hum Comp* **59**, 555-572.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Bailly, M., Guy, M.W., Wilkes, T.J., Guy, F.M., Davidson, I., Knechtli, R., Ward, R.D., Guilvard, E., Perieres, J., Dubois, H., 1984b. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cevennes. *Ann Parasitol Hum Comp* **59**, 555-572.
- Killick-Kendrick, R., Wilkes, T.J., Bailly, M., Bailly, I., Righton, L.A., 1986. Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **80**, 138-142.
- Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Egen, J., Lawyer, P., Fay, M.P., Kamhawi, S., Sacks, D., 2008. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10125-10130.
- King, T.P., Lu, G., Gonzalez, M., Qian, N., Soldatova, L., 1996. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* **98**, 588-600.
- Kongsuwan, K., Josh, P., Zhu, Y., Pearson, R., Gough, J., Colgrave, M.L., 2011. Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). *J Insect Physiol* **56**, 212-226.
- Krenn, H.W., Aspöck, H., 2012. Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Struct Dev* **41**, 101-118.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lainson, R., Ward, R.D., Shaw, J.J., 1977. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **199**, 309-320.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Ward, R.D., Fraiha, H., 1973. Leishmaniasis in Brazil. IX. Considerations on the *Leishmania braziliensis* complex. Importance of sandflies of the genus *Psychodopygus* (*Mangabeira*) in the transmission of *L. braziliensis braziliensis* in north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **67**, 184-196.
- Lane, R.P., Pile, M.M., Amerasinghe, F.P., 1990. Anthropophagy and aggregation behaviour of the sandfly *Phlebotomus argentipes* in Sri Lanka. *Med Vet Entomol* **4**, 79-88.
- Lanzaro, G.C., Lopes, A.H., Ribeiro, J.M., Shoemaker, C.B., Warburg, A., Soares, M., Titus, R.G., 1999. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Insect Mol Biol* **8**, 267-275.
- Laskay, T., van Zandbergen, G., Solbach, W., 2003. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* **11**, 210-214.
- Laurenti, M.D., da Matta, V.L., Pernichelli, T., Secundino, N.F., Pinto, L.C., Corbett, C.E., Pimenta, P.P., 2009a. Effects of salivary gland homogenate from wild-caught and laboratory-reared

*Lutzomyia longipalpis* on the evolution and immunomodulation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Scand J Immunol* **70**, 389-395.

Laurenti, M.D., Rossi, C.N., Matta, V.L., Tomokane, T.Y., Corbett, C.E., Secundino, N.F., Pimenta, P.F., Marcondes, M., 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol* **196**, 296-300.

Laurenti, M.D., Silveira, V.M., Secundino, N.F., Corbett, C.E., Pimenta, P.P., 2009b. Saliva of laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* exacerbates *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection more potently than saliva of wild-caught *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol Int* **58**, 220-226.

Leishman, W.B., 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J* **1**, 1252-1254.

Lerner, E.A., Ribeiro, J.M., Nelson, R.J., Lerner, M.R., 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* **266**, 11234-11236.

Lewis, D.J., 1987. Depth of penetration of vertebrate skin by phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ann Trop Med Parasitol* **81**, 173-179.

Lima, H.C., Titus, R.G., 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* **64**, 5442-5445.

Luengo-Arroyo, E., Nájera-Angulo, L., Lozano-Morales, A., 1947. Problema sanitario de la leishmaniosis visceral mediterránea en España. *Rev San Hig Púb* **21**, 301-331.

Macedo-Silva, V., Martins, D.R.A., Souza De Queiroz, P.V., Pinheiro, M.P.G., Freire, C.C.M., Queiroz, J.W., Dupnik, K.M., Pearson, R.D., Wilson, M.E., Jeronimo, S.M.B., Ximenes, F.M., 2014. Feeding Preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the Sand Fly Vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) *J Med Entomol* **51**, 237-244.

Mahamdallie, S., Ready, P., 2012. No recent adaptive selection on the apyrase of Mediterranean *Phlebotomus*: implications for using salivary peptides to vaccinate against canine leishmaniasis. *Evol Appl* **5**, 293-305.

Maia, C., Campino, L., 2011. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol* **27**, 341-344.

Maia, C., Gomes, J., Cristovao, J., Nunes, M., Martins, A., Rebelo, E., Campino, L., 2009. *Leishmania* survey on cats from a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Worldleish* 4, Lucknow, India, p. 267.

Maia, C., Gomes, J., Cristovao, J., Nunes, M., Martins, A., Rebelo, E., Campino, L., 2010. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol* **174**, 336-340.

Maia, C., Nunes, M., Campino, L., 2008. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis* **8**, 555-559.

Maia, C., Seblova, V., Sadlova, J., Votypka, J., Volf, P., 2011. Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatotropic strain. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1181.

- Maingon, R., Khela, A., Sampson, C., Ward, R., Walker, K., Exley, C., 2008. Aluminium: a natural adjuvant in *Leishmania* transmission via sand flies? *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**, 1140-1142.
- Marín-Iniesta, F., Marín-Iniesta, E., Martín-Luengo, F., 1982. Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la Región Murciana. Resultados preliminares. *Rev Iber Parasitol* **42**, 307-313.
- Maroli, M., Bettini, S., Tricoli, D., Khoury, C., Perrotti, E., 1991. Studies on mating plug of two sandfly species, *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Parassitologia* **33 Suppl**, 405-411.
- Maroli, M., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* **145**, 357-360.
- Marshall, N.A., Chapman, M.D., Saxon, A., 1986. Species-specific allergens from the salivary glands of Triatominae (Heteroptera:Reduviidae). *J Allergy Clin Immunol* **78**, 430-435.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M., 2012. An insight into the *Phlebotomus perniciosus* saliva by a proteomic approach. *Acta Trop* **123**, 22-30.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M., 2013a. Identifying salivary antigens of *Phlebotomus argentipes* by a 2DE approach. *Acta Trop* **126**, 229-239.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M., 2013b. Molecular and immunogenic properties of apyrase SP01B and D7-related SP04 recombinant salivary proteins of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid, Spain. *Biomed Res Int* **2013**, 526069.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Rohousova, I., Drahota, J., Volf, P., Jiménez, M., 2014. High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in hares and other animals in the emerging leishmaniasis focus in Madrid, Spain., <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.1002.1045>.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F., 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol* **145**, 267-273.
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Márquez, F., 2004. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **98**, 228-232.
- Marzouki, S., Abdeladhim, M., Abdessalem, C.B., Oliveira, F., Ferjani, B., Gilmore, D., Louzir, H., Valenzuela, J.G., Ben Ahmed, M., 2012. Salivary antigen SP32 is the immunodominant target of the antibody response to *Phlebotomus papatasi* bites in humans. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1911.
- Marzouki, S., Ben Ahmed, M., Boussoffara, T., Abdeladhim, M., Aleya-Bouafif, N.B., Namane, A., Hamida, N.B., Salah, A.B., Louzir, H., 2011. Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **84**, 653-661.
- Masucci, M., De Majo, M., Contarino, R.B., Borruto, G., Vitale, F., Pennisi, M.G., 2003. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Vet Res Commun* **27 Suppl 1**, 771-774.
- Mazeris, A., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Haralambous, C., Tsatsaris, A., Moschandreas, J., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Papadopoulos, B., Iovic, V., Pratlong, F., Loucaides, F., Antoniou, M., 2010. Leishmaniasis and the Cyprus paradox. *Am J Trop Med Hyg* **82**, 441-448.



- McCall, P.J., Cameron, M.M., 1995. Oviposition pheromones in insect vectors. *Parasitol Today* **11**, 352-355.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, A.C., Franca-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* **147**, 67-76.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E., 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound Emerg Dis* **58**, 352-357.
- Milleron, R.S., Mutebi, J.P., Valle, S., Montoya, A., Yin, H., Soong, L., Lanzaro, G.C., 2004a. Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **70**, 286-293.
- Milleron, R.S., Ribeiro, J.M., Elnaime, D., Soong, L., Lanzaro, G.C., 2004b. Negative effect of antibodies against maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **70**, 278-285.
- Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Gálvez, R., 2012. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasit Vectors* **5**, 60.
- Miró, G., Molina, R., 2006. Leishmaniosis canina: Manejo clínico y situación actual en España. Madrid, 144 pp. p.
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R., Sainz, A., 2013. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasit Vectors* **6**, 117.
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V., Montoya, A., 2014. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasit Vectors* **7**, 112.
- Molina, R., 1991. Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Res Rev Parasitol* **51**, 87-89.
- Molina, R., 1994. Capacidad vectorial de una colonia de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 en la leishmaniosis visceral. Tesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**, 491-493.
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* **190**, 268-271.
- Montoya-Lerma, J., 1992. Autogeny in the neotropical sand fly *Lutzomyia lichi* (Diptera: Psychodidae) from Colombia. *J Med Entomol* **29**, 698-699.
- Morais, R.C., Goncalves-de-Albuquerque, S.D., Silva, R.P., Costa, P.L., Silva, K.G., Silva, F.J., Brandao-Filho, S.P., Dantas-Torres, F., Paiva-Cavalcanti, M.D., 2013. Detection and quantification of *Leishmania braziliensis* in ectoparasites from dogs. *Vet Parasitol* **196**, 506-508.

- Moreno, I., Álvarez, J., García, N., de la Fuente, S., Martínez, I., Marino, E., Toraño, A., Goyache, J., Vilas, F., Domínguez, L., Domínguez, M., 2014. Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet Parasitol* **199**, 264-267.
- Moreno, I., Molina, R., Toraño, A., Laurín, E., García, E., Domínguez, M., 2007. Comparative real-time kinetic analysis of human complement killing of *Leishmania infantum* promastigotes derived from axenic culture or from *Phlebotomus perniciosus*. *Microbes Infect* **9**, 1574-1580.
- Moreno, J., Alvar, J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* **18**, 399-405.
- Morillas-Márquez, F., Benavides-Delgado, I., González-Castro, J., Reyes-Magaña, A., Valero-López, A., 1985. Occurrence of *Leishmania* sp. in *Rattus rattus* in the province of Granada *Ann Parasitol Hum Comp* **60**, 768-770.
- Morillas-Márquez, F., Sanchís-Marín, M.C., Martín-Sánchez, J., Acedo-Sánchez, C., 1991. On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the Province of Almería in southeastern Spain. *Parassitologia* **33 Suppl**, 437-444.
- Morillas, F., Sánchez Rabasco, F., Ocaña, J., Martín-Sánchez, J., Ocana-Wihelmi, J., Acedo, C., Sanchís-Marín, M.C., 1996. Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol Res* **82**, 569-570.
- Moro, O., Lerner, E.A., 1997. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem* **272**, 966-970.
- Morris, R.V., Shoemaker, C.B., David, J.R., Lanzaro, G.C., Titus, R.G., 2001. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* **167**, 5226-5230.
- Muller, G., Schlein, Y., 2004. Nectar and honeydew feeding of *Phlebotomus papatasi* in a focus of *Leishmania major* in Neot Hakikar oasis. *J Vector Ecol* **29**, 154-158.
- Munstermann, L., 2005. Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae, In: Marquardt, W.C. (Ed.) Biology of disease vectors. *Dana Dreibelbis*, San Diego, California, USA, pp. 141-151.
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrino, J., Parejo, J.C., Serrano, F.J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L.C., 2013. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop* **128**, 706-709.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G., 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**, 1561-1577.
- Myskova, J., Svobodova, M., Beverley, S.M., Volf, P., 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect* **9**, 317-324.
- Naiff, R.D., Freitas, R.A., Naiff, M.F., Arias, J.R., Barrett, T.V., Momen, H., Grimaldi Junior, G., 1991. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **86**, 317-321.
- Napier, L.E., Smith, R.O.A., Krishnan, K.V., 1933. The transmission of kala-azar to hamsters by the bite of the sandfly *Phlebotomus argentipes*. *Ind J Med Res* **21**, 299-304.

- Nazario, S., Das, S., de Silva, A.M., Deponte, K., Marcantonio, N., Anderson, J.F., Fish, D., Fikrig, E., Kantor, F.S., 1998. Prevention of *Borrelia burgdorferi* transmission in guinea pigs by tick immunity. *Am J Trop Med Hyg* **58**, 780-785.
- Newstead, R., 1911. The papataci flies (Phlebotomus) of the Maltese islands. *Bull Entomol Res* **2**, 47-48.
- Nieves, E., Buelvas, N., Rondon, M., Gonzalez, N., 2011. The salivary glands of two sand fly vectors of *Leishmania*: *Lutzomyia migonei* (Franca) and *Lutzomyia ovallesi* (Ortiz)(Diptera: Psychodidae). *Biomedica* **30**, 401-409.
- Norsworthy, N.B., Sun, J., Elnaiem, D., Lanzaro, G., Soong, L., 2004. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infect Immun* **72**, 1240-1247.
- Oleaga, A., Escudero-Población, A., Camafeita, E., Pérez-Sánchez, R., 2007. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochem Mol Biol* **37**, 1149-1159.
- Oliveira, F., Kamhawi, S., Seitz, A.E., Pham, V.M., Guigal, P.M., Fischer, L., Ward, J., Valenzuela, J.G., 2006. From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* **24**, 374-390.
- Oliveira, F., Lawyer, P.G., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2008. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl Trop Dis* **2**, e226.
- Oliveira, F., Traore, B., Gomes, R., Faye, O., Gilmore, D.C., Keita, S., Traore, P., Teixeira, C., Coulibaly, C.A., Samake, S., Meneses, C., Sissoko, I., Fairhurst, R.M., Fay, M.P., Anderson, J.M., Doumbia, S., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2012. Delayed-Type Hypersensitivity to Sand Fly Saliva in Humans from a Leishmaniasis-Endemic Area of Mali Is T(H)1-Mediated and Persists to Midlife. *J Invest Dermatol* **133**, 452-459.
- OMS, 2007. Informe de la V Reunión sobre coinfección *Leishmania*/VIH, Addis Abeba, Etiopía, 20 a 22 de marzo de 2007.
- OMS, 2010. Control de las leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis. OMS, Serie de informes técnicos nº 949, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010.
- OPS, 2009. Manual para el estudio e identificación de vectores de leishmaniasis. Organización Panamericana de la Salud. Curso Latinoamericano de estudio e identificación de vectores de leishmaniasis, Medellín, Colombia, 13 a 24 de abril de 2009.
- Owens, S.D., Oakley, D.A., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T.J., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P., Giger, U., 2001. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc* **219**, 1076-1083.
- Palosuo, K., Brummer-Korvenkontio, H., Mikkola, J., Sahi, T., Reunala, T., 1997. Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to *Aedes* mosquito bites. *Int Arch Allergy Immunol* **114**, 367-372.
- Paranhos-Silva, M., Oliveira, G.G., Reis, E.A., de Menezes, R.M., Fernandes, O., Sherlock, I., Gomes, R.B., Pontes-de-Carvalho, L.C., dos-Santos, W.L., 2003. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Vet Parasitol* **114**, 97-111.

- Patthy, L., 2008. Alternative Splicing. *Evolution eLS*.  
<http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0005084>.
- Peng, Z., Rasic, N., Liu, Y., Simons, F.E., 2002. Mosquito saliva-specific IgE and IgG antibodies in 1059 blood donors. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 816-817.
- Pennisi, M.G., Hartmann, K., Lloret, A., Addie, D., Belak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M.J., Lutz, H., Marsilio, F., Mostl, K., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M.C., 2013. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* **15**, 638-642.
- Pimenta, P.F., Saraiva, E.M., Rowton, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S.J., Sacks, D.L., 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9155-9159.
- Pimenta, P.F., Turco, S.J., McConville, M.J., Lawyer, P.G., Perkins, P.V., Sacks, D.L., 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* **256**, 1812-1815.
- Pinnas, J.L., Lindberg, R.E., Chen, T.M., Meinke, G.C., 1986. Studies of kissing bug-sensitive patients: evidence for the lack of cross-reactivity between *Triatoma protracta* and *Triatoma rubida* salivary gland extracts. *J Allergy Clin Immunol* **77**, 364-370.
- Pittaluga, G., 1912. Hallazgo de "*Leishmania infantum*" (protozoo parásito del "Kala-azar infantil") en la costa de Levante de España. *Bol Inst Nac Hig Alfonso XIII* **8**, 137-139.
- Pittaluga, G., 1913. Leishmaniosis espontánea del perro en la comarca de Tortosa. *Bol Soc Esp Biol* **2**, 132-133.
- Poinsignon, A., Remoue, F., Rossignol, M., Cornelie, S., Courtin, D., Grebaut, P., Garcia, A., Simondon, F., 2008. Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: an epidemiologic marker of exposure to *Glossina* bites. *Am J Trop Med Hyg* **78**, 750-753.
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M.J., Fisa, R., Castillejo, S., 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev. Iber. Parasitol.* **62**, 72-76.
- Prates, D.B., Araujo-Santos, T., Luz, N.F., Andrade, B.B., Franca-Costa, J., Afonso, L., Clarencio, J., Miranda, J.C., Bozza, P.T., Dosreis, G.A., Brodskyn, C., Barral-Netto, M., Borges, V.M., Barral, A., 2011. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *J Leukoc Biol* **90**, 575-582.
- Prates, D.B., Santos, L.D., Miranda, J.C., Souza, A.P., Palma, M.S., Barral-Netto, M., Barral, A., 2008. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *J Med Entomol* **45**, 409-413.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 1-20.
- Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M.A., Carter, S.D., Thomson, W., Ollier, W.E., 2003. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* **55**, 23-28.
- Qureshi, A.A., Asahina, A., Ohnuma, M., Tajima, M., Granstein, R.D., Lerner, E.A., 1996. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am J Trop Med Hyg* **54**, 665-671.

- Rachinsky, A., Guerrero, F.D., Scoles, G.A., 2008. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* **152**, 294-313.
- Ramalho-Ortigao, J.M., Kamhawi, S., Joshi, M.B., Reynoso, D., Lawyer, P.G., Dwyer, D.M., Sacks, D.L., Valenzuela, J.G., 2005. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Mol Biol* **14**, 703-712.
- Ramalho-Ortigao, M., Jochim, R.C., Anderson, J.M., Lawyer, P.G., Pham, V.M., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2007. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania-major*-infected sandflies. *BMC Genomics* **8**, 300.
- Ramírez, G.A., Penafiel-Verdu, C., Altimira, J., García-González, B., Vilafranca, M., 2012. Naturally Acquired Visceral Leishmaniosis in a Captive Bennett's Wallaby (*Macropus rufogriseus rufogriseus*). *Vet Pathol* **1**, 188-190.
- Ready, P.D., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* **15**, 19505.
- Ready, P.D., 2011. Should sand fly taxonomy predict vectorial and ecological traits? *J Vector Ecol* **36 Suppl 1**, S17-22.
- Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol* **58**, 227-250.
- Ready, P.D., Ready, P.A., 1981. Prevalence of *Phlebotomus* spp. in southern France: sampling bias due to different man-biting habits and autogeny. *Ann Trop Med Parasitol* **75**, 475-476.
- Ribeiro, J.M., 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* **32**, 463-478.
- Ribeiro, J.M., 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* **4**, 143-152.
- Ribeiro, J.M., Charlab, R., Rowton, E.D., Cupp, E.W., 2000a. *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. *J Med Entomol* **37**, 743-747.
- Ribeiro, J.M., Charlab, R., Valenzuela, J.G., 2001. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* **204**, 2001-2010.
- Ribeiro, J.M., Francischetti, I.M., 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* **48**, 73-88.
- Ribeiro, J.M., Katz, O., Pannell, L.K., Waitumbi, J., Warburg, A., 1999. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J Exp Biol* **202**, 1551-1559.
- Ribeiro, J.M., Mans, B.J., Arcà, B., 2010. An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochem Mol Biol* **40**, 767-784.
- Ribeiro, J.M., Mather, T.N., 1998. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Exp Parasitol* **89**, 213-221.
- Ribeiro, J.M., Modi, G., 2001. The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar. *J Parasitol* **87**, 915-917.

- Ribeiro, J.M., Rossignol, P.A., Spielman, A., 1986. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **83**, 683-686.
- Ribeiro, J.M., Rowton, E.D., Charlab, R., 2000b. The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagous sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Mol Biol* **30**, 279-285.
- Ribeiro, J.M., Vachereau, A., Modi, G.B., Tesh, R.B., 1989a. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science* **243**, 212-214.
- Ribeiro, J.M.C., Modi, G.B., Tesh, R.B., 1989b. Salivary apyrase activity of some Old World Phlebotomine sandflies. *Insect Biochem* **19**, 409-412.
- Rioux, J.A., Golvan, Y.J., 1969. Epidemiology des leishmanioses dans le sud de la France. Monograph 37: *Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, Paris*, 223.
- Rioux, J.A., Guilvard, E., Gállego, J., Moreno G., Pratlong, F., Portús, M., Risipail, P., Gállego, M., Bastien, P., 1986. *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer: Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne), IMEEE (Ed.) *Leishmania*. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Éco-Épidémiologiques. Montpellier, pp. 439-444.
- Rochael, N.C., Lima, L.G., Oliveira, S.M., Barcinski, M.A., Saraiva, E.M., Monteiro, R.Q., Pinto-da-Silva, L.H., 2013. *Leishmania amazonensis* exhibits phosphatidylserine-dependent procoagulant activity, a process that is counteracted by sandfly saliva. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **108**, 679-685.
- Rogers, M.E., 2012. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front Microbiol* **3**, 223.
- Rogers, M.E., Bates, P.A., 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog* **3**, e91.
- Rogers, M.E., Corware, K., Muller, I., Bates, P.A., 2010. *Leishmania infantum* proteophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, *Lutzomyia longipalpis*, promote parasite establishment in mouse skin and skin-distant tissues. *Microbes Infect* **12**, 875-879.
- Rogers, M.E., Chance, M.L., Bates, P.A., 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* **124**, 495-507.
- Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A., Bates, P.A., 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* **430**, 463-467.
- Rogo, L.M., Kokwaro, E.D., Mutinga, M.J., Khamala, C.P., 1992. Differentiation of vector species of phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Kenya by chorionic sculpturing of their eggs. *J Med Entomol* **29**, 1042-1044.
- Rohoušová, I., Hostomská, J., Vlková, M., Kobets, T., Lipoldova, M., Volf, P., 2011a. The protective effect against *Leishmania infection* conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure. *Int J Parasitol* **41**, 481-485.
- Rohoušová, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y., Volf, P., 2005a. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* **130**, 493-499.

- Rohoušová, I., Subrahmanyam, S., Volfová, V., Mu, J., Volf, P., Valenzuela, J.G., Jochim, R.C., 2012. Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1660.
- Rohoušová, I., Volf, P., 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol (Praha)* **53**, 161-171.
- Rohoušová, I., Volf, P., Lipoldova, M., 2005b. Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. *Parasite Immunol* **27**, 469-473.
- Rohoušová, I., Volfová, V., Nova, S., Volf, P., 2011b. Individual variability of salivary gland proteins in three *Phlebotomus* species. *Acta Trop* **122**, 80-86.
- Rondani, C., 1843. Species italicae generis Hebotomi, Rndn, ex insectis dipteris: fragmentum septimum and inveniendam dipterologian italicam. *Annals Soc Ent Fr* **1**, 263-267.
- Rossignol, P.A., Ribeiro, J.M., Jungery, M., Turell, M.J., Spielman, A., Bailey, C.L., 1985. Enhanced mosquito blood-finding success on parasitemic hosts: evidence for vector-parasite mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7725-7727.
- Rothmeier, A.S., Ruf, W., 2012. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Semin Immunopathol* **34**, 133-149.
- Ruiz-Fons, F., Ferroglio, E., Gortázar, C., 2013. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010. *Euro Surveill* **18**, 20541.
- Sacks, D., Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* **55**, 453-483.
- Sacks, D.L., 2001. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* **3**, 189-196.
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 406-411.
- Sadlova, J., Hajmova, M., Volf, P., 2003. *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*. *Med Vet Entomol* **17**, 244-250.
- Sadlova, J., Svobodova, M., Volf, P., 1999. *Leishmania major*: effect of repeated passages through sandfly vectors or murine hosts. *Ann Trop Med Parasitol* **93**, 599-611.
- Samuelson, J., Lerner, E., Tesh, R., Titus, R., 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J Exp Med* **173**, 49-54.
- Sánchez-Robert, E., Altet, L., Utzet-Sadurni, M., Giger, U., Sánchez, A., Francino, O., 2008. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* **39**, 36.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Santini, M.S., Fernandez, M.S., Perez, A.A., Sandoval, A.E., Salomon, O.D., 2012. *Lutzomyia longipalpis* abundance in the city of Posadas, northeastern Argentina: variations at different spatial scales. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**, 767-771.

- Schaffartzik, A., Weichel, M., Crameri, R., Bjornsdottir, T.S., Prisi, C., Rhyner, C., Torsteinsdottir, S., Marti, E., 2009. Cloning of IgE-binding proteins from *Simulium vittatum* and their potential significance as allergens for equine insect bite hypersensitivity. *Vet Immunol Immunopathol* **132**, 68-77.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L., Messer, G., 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9944-9948.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L., Shlomai, J., 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc Biol Sci* **245**, 121-126.
- Schlein, Y., Yuval, B., Warburg, A., 1984. Aggregation pheromone released from the palps of feeding female *Phlebotomus papatasi* (Psychodidae). *J Insect Physiol* **30**, 153-156.
- Schmitzova, J., Klaudivy, J., Albert, S., Schroder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J., Simuth, J., 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol Life Sci* **54**, 1020-1030.
- Schwartz, B.S., Ribeiro, J.M., Goldstein, M.D., 1990. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* **132**, 58-66.
- Schwarz, A., Helling, S., Collin, N., Teixeira, C.R., Medrano-Mercado, N., Hume, J.C., Assumpcao, T.C., Marcus, K., Stephan, C., Meyer, H.E., Ribeiro, J.M., Billingsley, P.F., Valenzuela, J.G., Sternberg, J.M., Schaub, G.A., 2009a. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. *PLoS Negl Trop Dis* **3**, e532.
- Schwarz, A., Juarez, J.A., Richards, J., Rath, B., Machaca, V.Q., Castro, Y.E., Malaga, E.S., Levy, K., Gilman, R.H., Bern, C., Verastegui, M., Levy, M.Z., 2011. Anti-triatomine saliva immunoassays for the evaluation of impregnated netting trials against Chagas disease transmission. *Int J Parasitol* **41**, 591-594.
- Schwarz, A., Medrano-Mercado, N., Billingsley, P.F., Schaub, G.A., Sternberg, J.M., 2010. IgM-antibody responses of chickens to salivary antigens of *Triatoma infestans* as early biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* **40**, 1295-1302.
- Schwarz, A., Sternberg, J.M., Johnston, V., Medrano-Mercado, N., Anderson, J.M., Hume, J.C., Valenzuela, J.G., Schaub, G.A., Billingsley, P.F., 2009b. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* **39**, 1021-1029.
- Seblova, V., Sadlova, J., Carpenter, S., Volf, P., 2012. Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. *J Med Entomol* **49**, 967-970.
- Secundino, N.F., Eger-Mangrich, I., Braga, E.M., Santoro, M.M., Pimenta, P.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J Med Entomol* **42**, 928-938.
- Serrano-Pinto, V., Acosta-Pérez, M., Luviano-Bazán, D., Hurtado-Sil, G., Batista, C.V., Martínez-Barnetche, J., Lanz-Mendoza, H., 2010. Differential expression of proteins in the midgut of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*. *Insect Biochem Mol Biol* **40**, 752-758.
- Sharma, U., Singh, S., 2008. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* **45**, 255-272.



- Sherry, K., Miro, G., Trotta, M., Miranda, C., Montoya, A., Espinosa, C., Ribas, F., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., 2011. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis* **11**, 239-245.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-858.
- Shortt, H.E., Smith, R.O.A., Swaminath, C.S., Krishnan, K.V., 1931. Transmission of Kala-azar by the bite of *Phlebotomine argentipes*. *Indian J Med Res* **18**, 1373-1375.
- Shortt, H.E., Swaminath, C.S., 1928. The method of feeding of *Phlebotomus argentipes* with relation to its bearing on the transmission of kala-azar. *Indian J Med Res* **15**, 827-836.
- Silva, F., Gomes, R., Prates, D., Miranda, J.C., Andrade, B., Barral-Netto, M., Barral, A., 2005. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* **72**, 94-98.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., Santos, R.L., 2009. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* **160**, 55-59.
- Slama, D., Haouas, N., Remadi, L., Mezhoud, H., Babba, H., Chaker, E., 2014. First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: ceratopogonidae). *Parasit Vectors* **7**, 51.
- Soares, B.R., Souza, A.P., Prates, D.B., de Oliveira, C.I., Barral-Netto, M., Miranda, J.C., Barral, A., 2013. Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral Leishmaniasis. *Sci Rep* **3**, 2352.
- Soares, M.B., Titus, R.G., Shoemaker, C.B., David, J.R., Bozza, M., 1998. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol* **160**, 1811-1816.
- Sobrinho, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Trisciuglio, A., Gortazar, C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* **155**, 198-203.
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellón, H., Serra, R., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D., Ferrer, L., 2003. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Vet J* **35**, 320-323.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2000. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* **90**, 37-45.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* **39**, 560-563.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portus, M., Alberola, J., 2007. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg* **76**, 676-680.
- Souza, A.P., Andrade, B.B., Aquino, D., Entringer, P., Miranda, J.C., Alcantara, R., Ruiz, D., Soto, M., Teixeira, C.R., Valenzuela, J.G., de Oliveira, C.I., Brodskyn, C.I., Barral-Netto, M., Barral, A., 2010. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e649.

- Srinivasan, R., Panicker, K.N., 1993. Laboratory observations on the biology of the phlebotomid sandfly, *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **24**, 536-539.
- Stern, R., Jedrzejewski, M.J., 2006. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev* **106**, 818-839.
- Suárez-Rodríguez, B., Isidoro-Fernández, B., Santos-Sanz, S., Sierra-Moros, M.J., Molina-Moreno, R., Astray-Mochales, J., Amela-Heras, C., 2012. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev Esp Salud Pública* **86**, 555-564.
- Svobodova, M., Votypka, J., Peckova, J., Dvorak, V., Nasereddin, A., Baneth, G., Sztern, J., Kravchenko, V., Orr, A., Meir, D., Schnur, L.F., Volf, P., Warburg, A., 2006. Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, Northern Israel. *Emerg Infect Dis* **12**, 1860-1868.
- Tang, Y., Ward, R.D., 1998a. Stomodaeal valve ultrastructure in the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Med Vet Entomol* **12**, 132-135.
- Tang, Y., Ward, R.D., 1998b. Sugar feeding and fluid destination control in the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Med Vet Entomol* **12**, 13-19.
- Tavares, N.M., Silva, R.A., Costa, D.J., Pitombo, M.A., Fukutani, K.F., Miranda, J.C., Valenzuela, J.G., Barral, A., de Oliveira, C.I., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., 2011. *Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19 protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1169.
- Teixeira, C., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., Seitz, A., Elnaiem, D.E., Caldas, A., de Souza, A.P., Brodskyn, C.I., de Oliveira, C.I., Mendonça, I., Costa, C.H., Volf, P., Barral, A., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2010. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e638.
- Teixeira, C., Gomes, R., Oliveira, F., Meneses, C., Gilmore, D.C., Elnaiem, D.E., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2014. Characterization of the Early Inflammatory Infiltrate at the Feeding Site of Infected Sand Flies in Mice Protected from Vector-Transmitted *Leishmania major* by Exposure to Uninfected Bites. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2781.
- Theodos, C.M., Ribeiro, J.M., Titus, R.G., 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immun* **59**, 1592-1598.
- Theodos, O., . 1935. A study of the reaction to *Phlebotomus* bites with some remarks on "harara". *Trans R Soc Trop Med Hyg* **29**, 273-284.
- Thiakaki, M., Rohousova, I., Volfova, V., Volf, P., Chang, K.P., Soteriadou, K., 2005. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes Infect* **7**, 760-766.
- Titus, R.G., Ribeiro, J.M., 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* **239**, 1306-1308.
- Trevello, R.T., Reisen, W.K., Yoshimura, G., Reeves, W.C., 2005. Detection of chicken antibodies to mosquito salivary gland antigens by enzyme immunoassay. *J Am Mosq Control Assoc* **21**, 39-48.

- Tripet, F., Clegg, S., Elnaïem, D.E., Ward, R.D., 2009. Cooperative blood-feeding and the function and implications of feeding aggregations in the sand fly, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *PLoS Negl Trop Dis* **3**, e503.
- Valenzuela, J.G., 2002. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochem Mol Biol* **32**, 1199-1209.
- Valenzuela, J.G., 2005. Blood-feeding arthropod salivary glands and saliva. Marquardt, W.C. (Ed.) *Biology of Disease Vectors. Dana Dreifelbis*, San Diego, California, USA, pp. 377-386.
- Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Garfield, M.K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Sacks, D.L., Ribeiro, J.M., 2001a. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* **194**, 331-342.
- Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Rowton, E., Ribeiro, J.M., 2001b. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases. *J Exp Biol* **204**, 229-237.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Galperin, M.Y., Ribeiro, J.M., 1998. Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme. *J Biol Chem* **273**, 30583-30590.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Gonzalez, E.C., de Miranda-Santos, I.K., Marinotti, O., Francischetti, I.M., Ribeiro, J.M., 2002a. The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Mol Biol* **11**, 149-155.
- Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M., Pham, V.M., Garfield, M.K., Ribeiro, J.M., 2003. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem Mol Biol* **33**, 717-732.
- Valenzuela, J.G., Garfield, M., Rowton, E.D., Pham, V.M., 2004. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J Exp Biol* **207**, 3717-3729.
- Valenzuela, J.G., Pham, V.M., Garfield, M.K., Francischetti, I.M., Ribeiro, J.M., 2002b. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **32**, 1101-1122.
- Vasconcelos, C.O., Coelho, Z.C., Chaves Cde, S., Teixeira, C.R., Pompeu, M.M., Teixeira, M.J., 2014. Distinct cellular migration induced by *Leishmania infantum chagasi* and saliva from *Lutzomyia longipalpis* in a hemorrhagic pool model. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **56**, 21-27.
- Vigoder, F.M., Souza, N.A., Peixoto, A.A., 2011. Acoustic signals in the sand fly *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Diptera: Psychodidae). *Parasit Vectors* **4**, 76.
- Vilas, F., Carpintero, J., Sevilla, S., Martínez, A., Ordobás, M., Bernal, J., Díaz, R., Iriso, A., Sevillano, O., Escacena, C., De La Fuente, S., Arce, A., Estirado, A., Frutos, J., Fúster, F., 2012. Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. Medidas de investigación y control medioambiental. *Profesión Veterinaria* **17**, 6-15.
- Vilela, M.L., Souza, N.A., Oliveira, S.M., Costa-Pinto, D., Cabello, P.H., Rangel, E.F., Traub-Cseko, Y.M., 2006. Considerations on the effect of anti-sandfly antibodies on biological parameters of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Braz J Biol* **66**, 175-183.

- Vinhas, V., Andrade, B.B., Paes, F., Bomura, A., Clarencio, J., Miranda, J.C., Bafica, A., Barral, A., Barral-Netto, M., 2007. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *Eur J Immunol* **37**, 3111-3121.
- Vitorino, R., Lobo, M.J., Ferrer-Correia, A.J., Dubin, J.R., Tomer, K.B., Domingues, P.M., Amado, F.M., 2004. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* **4**, 1109-1115.
- Vlková, M., Rohoušová, I., Drahot, J., Stanneck, D., Kruehwagen, E.M., Mencke, N., Otranto, D., Volf, P., 2011. Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1344.
- Vlková, M., Rohoušová, I., Hostomská, J., Pohanková, L., Zidková, L., Drahot, J., Valenzuela, J.G., Volf, P., 2012. Kinetics of antibody response in BALB/c and C57BL/6 mice bitten by *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1719.
- Vlková, M., Sima, M., Rohoušová, I., Kostalova, T., Sumova, P., Volfova, V., Jaske, E.L., Barbian, K.D., Gebre-Michael, T., Hailu, A., Warburg, A., Ribeiro, J.M., Valenzuela, J.G., Jochim, R.C., Volf, P., 2014. Comparative Analysis of Salivary Gland Transcriptomes of *Phlebotomus orientalis* Sand Flies from Endemic and Non-endemic Foci of Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2709.
- Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J., Votypka, J., 2004. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *Int J Parasitol* **34**, 1221-1227.
- Volf, P., Myskova, J., 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol* **23**, 91-92.
- Volf, P., Rohoušová, I., 2001. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* **122 Pt 1**, 37-41.
- Volf, P., Skarupova, S., Man, P., 2002. Characterization of the lectin from females of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. *Eur J Biochem* **269**, 6294-6301.
- Volf, P., Tesarova, P., Nohynkova, E.N., 2000. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Med Vet Entomol* **14**, 251-256.
- Volf, P., Volfova, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol* **36 Suppl 1**, S1-9.
- Volfova, V., Hostomska, J., Cerny, M., Votypka, J., Volf, P., 2008. Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on leishmania infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis* **2**, e294.
- Wahba, M., Riera, C., 2006. Salivary gland composition of some Old World vector sand fly. *J Egypt Soc Parasitol* **36**, 289-296.
- Wakid, M.H., Bates, P.A., 2004. Flagellar attachment of *Leishmania* promastigotes to plastic film in vitro. *Exp Parasitol* **106**, 173-178.
- Walsh, C., Gangloff, M., Monie, T., Smyth, T., Wei, B., McKinley, T.J., Maskell, D., Gay, N., Bryant, C., 2008. Elucidation of the MD-2/TLR4 interface required for signaling by lipid IVA. *J Immunol* **181**, 1245-1254.

- Walters, L.L., Irons, K.P., Chaplin, G., Tesh, R.B., 1993a. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* **30**, 699-718.
- Walters, L.L., Irons, K.P., Guzman, H., Tesh, R.B., 1993b. Formation and composition of the peritrophic membrane in the sand fly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* **30**, 179-198.
- Wang, X., Ribeiro, J.M., Broce, A.B., Wilkerson, M.J., Kanost, M.R., 2009. An insight into the transcriptome and proteome of the salivary gland of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem Mol Biol* **39**, 607-614.
- Warburg, A., 2008. The structure of the female sand fly (*Phlebotomus papatasi*) alimentary canal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**, 161-166.
- Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G.C., Titus, R.G., Neva, F., 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **345**, 223-230.
- Warburg, A., Schlein, Y., 1986. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg* **35**, 926-930.
- Ward, R.D., Hamilton, J. G. C., Dougherty, M., Falcao, A. L., Feliciangeli, M. D., Perez, J. E., Veltkamp, C. J., 1993. Pheromone disseminating structures in tergites of male phlebotomines (Diptera: Psychodidae). *Bull Entomol Res* **83**, 437-445.
- Ward, R.D., Morton, I.E., 1991. Pheromones in mate choice and sexual isolation between siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Parassitologia* **33 Suppl**, 527-533.
- Ward, R.D., Phillips, A., Burnet, B., Marcondes, C.B., 1988. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution, In: Service, M.W. (Ed.) *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Clarendon Press, Oxford, pp. 257-269.
- Wasinpiyamongkol, L., Patramool, S., Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Doucoure, S., Mouchet, F., Seveno, M., Remoue, F., Demetree, E., Brizard, J.P., Jouin, P., Biron, D.G., Thomas, F., Misse, D., 2009. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics* **10**, 1906-1916.
- Weinkopff, T., de Oliveira, C.I., de Carvalho, A.M., Hauyon-La Torre, Y., Muniz, A.C., Miranda, J.C., Barral, A., Tacchini-Cottier, F., 2014. Repeated Exposure to *Lutzomyia intermedia* Sand Fly Saliva Induces Local Expression of Interferon-Inducible Genes Both at the Site of Injection in Mice and in Human Blood. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2627.
- Wekesa, J.W., Copeland, R.S., Mwangi, R.W., 1992. Effect of *Plasmodium falciparum* on blood feeding behavior of naturally infected *Anopheles* mosquitoes in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* **47**, 484-488.
- Wheat, W.H., Pauken, K.E., Morris, R.V., Titus, R.G., 2008. *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. *J Immunol* **180**, 8286-8298.
- Wheeler, C.M., Coleman, J.L., Benach, J.L., 1991. Salivary gland antigens of *Ixodes dammini* are glycoproteins that have interspecies cross-reactivity. *J Parasitol* **77**, 965-973.

- Wikel, S.K., Ramachandra, R.N., Bergman, D.K., Burkot, T.R., Piesman, J., 1997. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infect Immun* **65**, 335-338.
- Wilson, A.D., Heesom, K.J., Mawby, W.J., Mellor, P.S., Russell, C.L., 2008. Identification of abundant proteins and potential allergens in *Culicoides nubeculosus* salivary glands. *Vet Immunol Immunopathol* **122**, 94-103.
- Wu, W.K., Tesh, R.B., 1990a. Genetic factors controlling susceptibility to *Leishmania major* infection in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* **42**, 329-334.
- Wu, W.K., Tesh, R.B., 1990b. Selection of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) lines susceptible and refractory to *Leishmania major* infection. *Am J Trop Med Hyg* **42**, 320-328.
- Xu, X., Oliveira, F., Chang, B.W., Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Reynoso, D., Pham, V.M., Elnaiem, D.E., Kamhawi, S., Ribeiro, J.M., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., 2011. Structure and function of a "yellow" protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. *J Biol Chem* **286**, 32383-32393.
- Xu, X., Yang, H., Ma, D., Wu, J., Wang, Y., Song, Y., Wang, X., Lu, Y., Yang, J., Lai, R., 2008. Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands. *Mol Cell Proteomics* **7**, 582-590.
- Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem American Entomol Inst* **54**, 1-881.
- Zahedifard, F., Gholami, E., Taheri, T., Taslimi, Y., Doustdari, F., Seyed, N., Torkashvand, F., Meneses, C., Papadopoulou, B., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Rafati, S., 2014. Enhanced protective efficacy of nonpathogenic recombinant *Leishmania tarentolae* expressing cysteine proteinases combined with a sand fly salivary antigen. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2751.
- Zer, R., Yaroslavski, I., Rosen, L., Warburg, A., 2001. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol* **31**, 810-814.









## 8 APÉNDICE

### 8.1 Lista de figuras

FIGURA 1. LOS PARÁSITOS CAUSANTES DE LA LEISHMANIOSIS. FUENTE: MODIFICADO DE OMS (2010). .....	12
FIGURA 2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA LEISHMANIOSIS. A) LEISHMANIOSIS CUTÁNEA. B) LEISHMANIOSIS CUTÁNEA DIFUSA. C) LEISHMANIOSIS DÉRMICA POSKALA-AZAR. D) LEISHMANIOSIS MUCO-CUTÁNEA. E) LEISHMANIOSIS VISCERAL. FUENTE: FOTOGRAFÍAS A-D TOMADAS DE <i>THE WELLCOME TRUST</i> (2000). FOTOGRAFÍA E TOMADA DE MURRAY Y COL. (2005).....	13
FIGURA 3. MORFOLOGÍA DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> . A) AMASTIGOTES EN UN MACRÓFAGO DEL HÍGADO DE UN CRICETO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE CON <i>L. INFANTUM</i> . B) PROMASTIGOTES PROCEDENTES DEL TUBO DIGESTIVO DE UN FLEBOTOMO INFECTADO CON <i>L. INFANTUM</i> EN EL LABORATORIO. AMBAS PREPARACIONES ESTÁN TEÑIDAS CON GIEMSA. FUENTE: UNIDAD DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA (ISCIII). .....	15
FIGURA 4. CICLO BIOLÓGICO DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> . FUENTE: IMAGEN MODIFICADA DE <i>THE WELLCOME TRUST</i> (2000). .....	16
FIGURA 5. LEISHMANIOSIS CANINA. A) QUERATOCONJUNTIVITIS PURULENTA CON DERMATITIS PERIOCLAR. B) LESIONES DÉRMICAS FACIALES CON DERMATITIS EXFOLIATIVA. C) EPISTAXIS. D) ONICOGRIPOSIS. E) ÚLCERA DÉRMICA EN LA OREJA. FUENTE: BANETH Y COL. (2008). .....	18
FIGURA 6. LOCALIZACIÓN DEL BROTE EPIDÉMICO DE LEISHMANIOSIS EN LA CM. FUENTE: IMAGEN MODIFICADA DE ARCE Y COL. (2013).....	23
FIGURA 7. PRIMER DIBUJO DE UN FLEBOTOMO. FUENTE: BONANNI (1691). .....	25
FIGURA 8. CICLO VITAL DE LOS FLEBOTOMOS. A) HUEVO. B) LARVA. C) PUPA. D) ADULTO. E) HEMBRA ALIMENTÁNDOSE SOBRE UN HOSPEDADOR VERTEBRADO. FUENTE: <i>THE WELLCOME TRUST</i> (2000), UEM (ISCIII) Y PÁGINA WEB DE PARASITOLOGÍA VETERINARIA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA ( <a href="http://pagines.uab.cat/parvet/">HTTP://PAGINES.UAB.CAT/PARVET/</a> ). FUENTE DE LA IMAGEN CENTRAL: ROD DILLON ( <a href="http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle_habitats.htm">HTTP://PCWWW.LIV.AC.UK/LEISHMANIA/LIFE_CYCLE_HABITATS.HTM</a> ).....	27
FIGURA 9. APAREAMIENTO DE <i>PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS</i> . FUENTE: UEM (ISCIII). .....	32
FIGURA 10. APARATO BUCAL DE <i>PHLEBOTOMUS DUBOSCQI</i> . A) PALPOS MAXILARES (Mxp) QUE ACTÚAN COMO ÓRGANOS SENSORIALES PRÓXIMOS A LA PROBÓSCIDE. LAS ESTRUCTURAS CORTANTES DEL APARATO BUCAL ESTÁN CUBIERTAS POR EL LABIO (LA). B) VISTA FRONTAL DE LA PROBÓSCIDE. C) SECCIÓN DE LA PROBÓSCIDE. EL CANAL ALIMENTICIO SE LOCALIZA ENTRE EL LABRO (LR), HIPOFARINGE (HY) Y LACINIA (LC). D) EN LA PORCIÓN POSTERIOR DE LA PROBÓSCIDE SE ENCUENTRAN LAS LABELAS (LB), CON MULTITUD DE SETAS SENSORIALES, DE LAS QUE SOBRESALEN LAS ESTRUCTURAS CORTANTES (LABRO Y MANDÍBULAS). FUENTE: KRENN Y ASPOCK (2012).....	34
FIGURA 11. CORTE SAGITAL DE <i>P. ARGENTIPES</i> FIJADO EN EL MOMENTO DE LA ALIMENTACIÓN SANGUÍNEA. FUENTE: SHORTT Y SWAMINATH (1928). .....	35
FIGURA 12. A) FLEBOTOMO RECIÉN ALIMENTADO. B) DISECCIÓN DEL TUBO DIGESTIVO REPLETO DE SANGRE. FUENTE: UEM (ISCIII).....	36
FIGURA 13. DESARROLLO DE ESPECIES SUPRAPILÓRICAS DE <i>LEISHMANIA</i> EN EL TUBO DIGESTIVO DEL FLEBOTOMO. A) AMASTIGOTES. B) PROMASTIGOTES PROCÍCLICOS. C) NECTOMONAS. D) LEPTOMONAS. E) PROMASTIGOTES METACÍCLICOS. F) HAPTOMONAS. FUENTE: IMAGEN MODIFICADA DE DOSTALOVA Y VOLF (2012).....	40

FIGURA 14. DISECCIONES DEL TUBO DIGESTIVO DE <i>P. PERNICIOSUS</i> INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON <i>L. INFANTUM</i> . A) TUBO DIGESTIVO COMPLETO. B) VÁLVULA ESTOMODEAL REPLETA DE PARÁSITOS. FUENTE: UEM (ISCIII).....	41
FIGURA 15. APARATO SALIVAL DE UN FLEBOTOMO. EN VERDE SE DESTACAN LAS GLÁNDULAS SALIVALES, EL CONDUCTO SALIVAL COMÚN Y LA BOMBA SALIVAL. FUENTE: IMAGEN MODIFICADA DE JOBLING (1978).....	47
FIGURA 16. DETALLE DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PAPATASI</i> . ESCALA EN MM. FUENTE: IMAGEN MODIFICADA DE JOBLING (1978).....	47
FIGURA 17. GLÁNDULAS SALIVALES EN VARIOS ESTADIOS A LO LARGO DEL TIEMPO TRAS LA ALIMENTACIÓN CON SANGRE (A-E). FUENTE: ADLER Y THEODOR (1926).....	50
FIGURA 18. EFECTOS DE LA SALIVA DE <i>L. LONGIPALPIS</i> SOBRE EL SISTEMA INMUNE DEL HOSPEDADOR VERTEBRADO. 1) INFILTRACIÓN DE CÉLULAS INFLAMATORIAS HACIA EL LUGAR DE LA PICADURA. 2) PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LAS PROTEÍNAS SALIVALES. 3) FORMACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS EN LA FASE TEMPRANA, TRAS LA PICADURA. 4) MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE CITOQUINAS Y PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS POR LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO. FUENTE: IMAGEN MODIFICADA DE ANDRADE Y COL. (2007).....	67
FIGURA 19. EFECTO DE LA SALIVA SOBRE LA INFECCIÓN POR <i>L. MAJOR</i> EN RATONES EXPUESTOS O NO AL EXTRACTO SALIVAL DE <i>L. LONGIPALPIS</i> . FUENTE: IMAGEN MODIFICADA DE BELKAID Y COL. (1998). ....	70
FIGURA 20. MODELO HIPOTÉTICO DEL MECANISMO PROTECTOR INDUCIDO POR LA SALIVA DE LOS FLEBOTOMOS FRENTE A LA INFECCIÓN POR <i>LEISHMANIA</i> . INMUNIZACIÓN CON LA SALIVA A TRAVÉS DE 1) LAS PICADURAS DE FLEBOTOMOS NO INFECTADOS O 2) POR ADMINISTRACIÓN DE UNA MOLÉCULA DE LA SALIVA. 3) CAPTACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SALIVALES POR LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO (APCs), Y ACTIVACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y EXPANSIÓN CLONAL DE LINFOCITOS T CD4+ EN LOS NÓDULOS LINFÁTICOS. 4) PICADURA INFECTIVA POSTERIOR. 5) RÁPIDO RECLUTAMIENTO DE LAS CÉLULAS T, MAYORITARIAMENTE CD4+ PRODUCTORAS DE IFN- $\gamma$ , DESDE LOS NÓDULOS LINFÁTICOS HASTA LA DERMIS. 6) REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (DTH) CON RECLUTAMIENTO CELULAR EN EL LUGAR DE LA PICADURA Y ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS MEDIADA POR IFN- $\gamma$ QUE PROMUEVE LA DESTRUCCIÓN DE <i>LEISHMANIA</i> . FUENTE: IMAGEN MODIFICADA DE GOMES Y OLIVEIRA (2012). ....	73
FIGURA 21. MANTENIMIENTO DE COLONIAS DE FLEBOTOMOS EN EL LABORATORIO. A) HUEVOS EN FRASCO DE OVIPOSICIÓN. B, E Y F) FRASCOS DE MANTENIMIENTO LARVARIO. C) ALIMENTACIÓN DE LARVAS. D) DETALLE DE LARVAS. G) ADULTOS EN JAULA DE MANTENIMIENTO. H) CÁMARA CLIMÁTICA. I Y J) ALIMENTACIÓN CON SANGRE DE CRICETO. K) HEMBRA RECIÉN ALIMENTADA. L) TRASVASE DE LAS HEMBRAS ALIMENTADAS A FRASCOS DE OVIPOSICIÓN. FUENTE: UEM (ISCIII).....	90
FIGURA 22. DISECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE GLÁNDULAS SALIVALES DE FLEBOTOMOS. FUENTE: UEM (ISCIII). ....	91
FIGURA 23. ESQUEMA SEGUIDO EN LA PAUTA 1 PARA LA INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB/C CON LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> A TRAVÉS DE LA PICADURA.....	99
FIGURA 24. ESQUEMA SEGUIDO EN LA PAUTA 2 PARA LA INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB/C CON LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> A TRAVÉS DE LA PICADURA.....	99
FIGURA 25. ESQUEMA SEGUIDO EN LA PAUTA 3 PARA LA INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB/C CON LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> A TRAVÉS DE LA PICADURA.....	100
FIGURA 26. ESQUEMA SEGUIDO PARA LA INMUNIZACIÓN DE LOS CRICETOS CON LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> A TRAVÉS DE LA PICADURA. ....	101
FIGURA 27. ESQUEMA SEGUIDO PARA LA INMUNIZACIÓN DE LOS CONEJOS CON LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> A TRAVÉS DE LA PICADURA. ....	102

FIGURA 28. DETALLE DE LOCALIZACIÓN MANUAL DE LA SECUENCIA DE ADNc EN EL ELECTROFEROGRAMA ENTRE A) EL CODÓN DE INICIO EN EL EXTREMO 5' Y B) LA COLA DE POLIADENINAS EN EL EXTREMO 3' .....	111
FIGURA 29. ESQUEMA DE LA SUBCLONACIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES DE LAS PROTEÍNAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> .....	116
FIGURA 30. GEL DE POLIACRILAMIDA DEL EXTRACTO PROTEICO DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE LAS CUATRO COLONIAS ESTUDIADAS. ARG: <i>P. ARGENTIPES</i> . PER-M: <i>P. PERNICIOSUS</i> DE BOADILLA DEL MONTE, MADRID. PER-Z: <i>P. PERNICIOSUS</i> DE ZARAGOZA. PER-V: <i>P. PERNICIOSUS</i> DE VALENCIA.....	131
FIGURA 31. COMPARACIÓN DEL PATRÓN PROTEICO DEL EXTRACTO DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> EN FUNCIÓN DE LA EDAD. D1-D8: PATRÓN PROTEICO LOS DÍAS 1 A 8 DE LA EMERGENCIA DE LOS ADULTOS. ....	132
FIGURA 32. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS DE 60 GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> . A) TIRAS IPG DE PH 3 A 10. B) TIRAS IPG DE PH 4 A 7. C) TIRAS IPG DE PH 7 A 10. LOS NÚMEROS EN LOS GELES SE CORRESPONDEN CON LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS, DESCRITAS EN LA TABLA 21.....	133
FIGURA 33. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS PREPARADOS A PARTIR DE DIFERENTE NÚMERO DE GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> , UTILIZANDO TIRAS IPG DE PH 7 A 10 Y 7 A 11. A) 60 GLÁNDULAS. B) 30 GLÁNDULAS. C) 15 GLÁNDULAS. ....	134
FIGURA 34. ALINEAMIENTOS DE LAS PROTEÍNAS SP16 DE <i>P. ARIASI</i> (GENBANK: AAX55660) Y SP13 DE <i>P. ARGENTIPES</i> (GENBANK: ABA12144) CON SUS HOMÓLOGOS RESPECTIVOS EN <i>P. PERNICIOSUS</i> (SP04, GENBANK: ABA43051 Y SP09, GENBANK: ABA43057, RESPECTIVAMENTE). A) ALINEAMIENTO DE AAX55660 CON ABA43051. B) ALINEAMIENTO DE ABA12144 CON ABA43057. LAS ZONAS SUBRAYADAS INDICAN LOS AMINOÁCIDOS IDENTIFICADOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS. LOS ASTERISCOS INDICAN LOS AMINOÁCIDOS NO COINCIDENTES EN LOS PÉPTIDOS SECUENCIADOS.....	141
FIGURA 35. INMUNIZACIÓN DE ANIMALES CON LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> A TRAVÉS DE LA PICADURA. A) RATONES BALB/C ANESTESIADOS RECIBIENDO PICADURAS DE <i>P. PERNICIOSUS</i> . B) FLEBOTOMOS ALIMENTÁNDOSE SOBRE LOS CRICETOS ANESTESIADOS. EN AMBOS CASOS, LAS PICADURAS FUNDAMENTALMENTE SE PRODUCEN EN LAS ZONAS DEL ANIMAL CON MENOS PELO (PATAS Y OREJAS). C) DETALLE DE UN FLEBOTOMO ALIMENTÁNDOSE DE LA OREJA DE UN RATÓN, IMAGEN TOMADA A TRAVÉS DE UN MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO. ....	143
FIGURA 36. NIVELES DE ANTICUERPOS IgG FRENTE A LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> EN SUEROS DE ANIMALES INMUNIZADOS DE ACUERDO A LAS DIFERENTES PAUTAS. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO LA MEDIA DE LOS VALORES DE DENSIDAD ÓPTICA AJUSTADA. ....	146
FIGURA 37. A) ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> . B) RECONOCIMIENTO MEDIANTE WB DE LAS PROTEÍNAS DE LA SALIVA TRAS ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL (40 GLÁNDULAS) Y BIDIMENSIONAL (100 GLÁNDULAS), UTILIZANDO SUEROS HIPERINMUNES DE CRICETOS. ....	147
FIGURA 38. A) ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> . B) RECONOCIMIENTO MEDIANTE WB DE LAS PROTEÍNAS DE LA SALIVA TRAS ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL (40 GLÁNDULAS) Y BIDIMENSIONAL (150 GLÁNDULAS), UTILIZANDO SUEROS HIPERINMUNES DE RATONES.....	148
FIGURA 39. CINÉTICA DE ANTICUERPOS IgG ANTISALIVA EN RATONES BALB/c. A) NIVELES DE ANTICUERPOS EXPRESADOS EN DO O B) EN ÍNDICES. LA EXTRACCIÓN DE SANGRE DE LOS RATONES R5 A R8 SE INICIÓ EN LA SEMANA 13.....	150
FIGURA 40. RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ANTICUERPOS IgG ANTISALIVA Y EL NÚMERO DE PICADURAS ACUMULADAS EN LOS RATONES BALB/c. A) RATÓN 1, R=0'9909. B) RATÓN 2, R=0'9182. C) RATÓN 3, R=0'9909 Y D) RATÓN 4, R=0'9515. ....	151

- FIGURA 41. INMUNIZACIÓN DE CONEJOS A TRAVÉS DE LA PICADURA DE FLEBOTOMOS. A) CONEJOS ANESTESIADOS EN EL INTERIOR DE LAS JAULAS JUNTO CON LOS FLEBOTOMOS. B) DETALLE DE UN CONEJO EN EL INTERIOR DE LA JAULA. C) FLEBOTOMOS ALIMENTÁNDOSE DE LA OREJA DE UN CONEJO. .... 152
- FIGURA 42. CINÉTICA DE ANTICUERPOS IgG ANTISALIVA EN CONEJOS. NIVEL DE ANTICUERPOS DE TIPO IgG FRENTE A LA SALIVA DE *P. PERNICIOSUS* A LO LARGO DE LA INMUNIZACIÓN DE LOS CONEJOS. .... 153
- FIGURA 43. RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LA SALIVA DE *P. PERNICIOSUS* TRAS LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA MONODIMENSIONAL, UTILIZANDO LOS SUEROS DEL CONEJO C1. A) SDS-PAGE DE 20 GLÁNDULAS SALIVALES DE *P. PERNICIOSUS* EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12,5% MEDIANTE TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE COLOIDAL. B) WB DE LAS PROTEÍNAS SALIVALES DE *P. PERNICIOSUS*. LA MEMBRANA DE PVDF (20 GLÁNDULAS/CARRIL) SE CORTÓ EN 4 PARTES, INCUBADAS CON EL SUERO PREINMUNE (CARRIL C) Y CON LOS SUEROS OBTENIDOS TRAS LA 1ª, 2ª Y 3ª INMUNIZACIÓN (CARRILES 1, 2 Y 3, RESPECTIVAMENTE). M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *PRECISION PLUS DUAL XTRA* (BIO-RAD®). .... 155
- FIGURA 44. ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LOS ANTICUERPOS SALIVALES FRENTE A *P. PERNICIOSUS* Y *P. ARGENTIPES*. A) DETECCIÓN MEDIANTE ELISA DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS DE TIPO IgG EN LOS SUEROS DE CRICETOS INMUNIZADOS CON LA SALIVA DE *P. PERNICIOSUS* DE MADRID (PER-M) Y *P. ARGENTIPES* (ARG) USANDO SGH DE AMBAS ESPECIES. NIVELES DE ANTICUERPOS EXPRESADOS COMO LA MEDIA DE LA DENSIDAD ÓPTICA AJUSTADA. B) RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS SALIVALES DE PER-M Y ARG POR SUEROS DE ANIMALES INMUNIZADOS CON LA SALIVA DE PER-M Y ARG, MEDIANTE WB (40 GLÁNDULAS/CARRIL) Y SU CORRESPONDIENTE GEL TEÑIDO CON PLATA (15 GLÁNDULAS/CARRIL). CARRIL C: CONTROL. .... 157
- FIGURA 45. ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LOS ANTICUERPOS SALIVALES DE *P. PERNICIOSUS*, *P. SERGENTI*, *P. PAPATASI* Y *L. LONGIPALPIS*. DETECCIÓN MEDIANTE ELISA DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS DE TIPO IgG EN LOS SUEROS DE ANIMALES INMUNIZADOS CON LA SALIVA DE *P. PERNICIOSUS* DE MURCIA (PER-MU), *P. SERGENTI* (SER), *P. PAPATASI* (PAP) Y *L. LONGIPALPIS* (LON), USANDO SGH DE DICHAS ESPECIES. C: CONTROL. EL NIVEL DE ANTICUERPOS ESTÁ EXPRESADO COMO LA MEDIA DE LA DENSIDAD ÓPTICA AJUSTADA DE 2 SUEROS HIPERINMUNES DE RATÓN SKH. .... 158
- FIGURA 46. AMPLIFICACIÓN DE LOS ADNc DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE *P. PERNICIOSUS*. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE 5 µL DE PRODUCTO DE PCR DE LOS ADNc OBTENIDO MEDIANTE 20 CICLOS DE AMPLIFICACIÓN. M1: MARCADOR DE 100 PB. M2: MARCADOR DE 1 Kb (BIOTOOLS®). .... 159
- FIGURA 47. ANÁLISIS DE LA GENOTECA DE ADNc DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE *P. PERNICIOSUS*. A) AISLAMIENTO DE LOS HALOS DE LISIS CORRESPONDIENTES A LAS CÉLULAS BACTERIANAS INFECTADAS POR LOS FAGOS. B) DETERMINACIÓN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL TAMAÑO DEL INSERTO PRESENTE EN DICHOS FAGOS. LOS FAGOS 2, 5, 7 Y 9 NO SON RECOMBINANTES Y LA BANDA DETECTADA SE CORRESPONDE CON LA AMPLIFICACIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS DEL VECTOR PRESENTES ENTRE LOS CEBADORES USADOS. M: MARCADOR DE 1 Kb (BIOTOOLS®). .... 160
- FIGURA 48. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE APIRASAS DE FLEBOTOMOS Y OTRAS SECUENCIAS RELACIONADAS: *L. LONGIPALPIS* (LON), *L. INTERMEDIA* (INT), *L. AYACUCHENSIS* (AYA), *P. ARABICUS* (ARA), *P. ARIASI* (ARI), *P. PERNICIOSUS* DE ITALIA (PERITA), *P. PERNICIOSUS* DE ESPAÑA (PERSPA), *P. TOBBI* (TOB), *P. ARGENTIPES* (ARG), *P. DUBOSCHI* (DUB), *P. PAPATASI* (PAP), *P. SERGENTI* (SER), *HOMO SAPIENS* (HUM), *D. MELANOGASTER* (DRO), *C. LECTULARIUS* (CIM). (\*) Y (Ø): CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DEL ÍNDICE ANTIGÉNICO Y EN LA ESTRUCTURA SECUNDARIA ENTRE PERSPA Y PERITA. (□): CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DE LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN, EL AMINOÁCIDO AFECTADO APARECE RODEADO POR UN CÍRCULO. (▼) Y (+): SITIOS DE UNIÓN DE NUCLEÓTIDOS Y  $Ca^{2+}$ , RESPECTIVAMENTE. .... 166
- FIGURA 49. ALINEAMIENTO NUCEOTÍDICO DE SP04B DE *P. PERNICIOSUS* DE ESPAÑA (PERSPA) Y SP04B DE *P. PERNICIOSUS* DE ITALIA (PERITA). EL CODÓN DE PARADA ANTERIOR SE MUESTRA ENCUADRADO EN ROJO. .... 167
- FIGURA 50. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON D7 DE FLEBOTOMOS Y OTRAS SECUENCIAS RELACIONADAS: *L. LONGIPALPIS* (LON), *L. INTERMEDIA* (INT), *L. AYACUCHENSIS* (AYA), *P. ARABICUS* (ARA), *P. ARIASI* (ARI), *P. PERNICIOSUS* DE ITALIA (PERITA), *P. PERNICIOSUS* DE ESPAÑA (PERSPA),

- P. TOBBI* (TOB), *P. ARGENTIPES* (ARG), *P. DUBOSQI* (DUB), *P. PAPATASI* (PAP), *P. SERGENTI* (SER), *ANOPHELES STEPHENSI* (ANS), *AE. AEGYPTI* (AED). (\*): CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DEL ÍNDICE ANTIGÉNICO ENTRE PERSPA Y PERITA. (♠): RESIDUOS CONSERVADOS DE CISTEÍNA. (□): MOTIVO DE UNIÓN A CISTEINIL LEUCOTRIENOS. (▼): POLIMORFISMO EN R<sup>51</sup> RESPECTO AL AMINOÁCIDO TRIPTÓFANO EN EL MOTIVO DE UNIÓN A LEUCOTRIENOS. (○): POLIMORFISMO EN F<sup>64</sup> RESPECTO AL AMINOÁCIDO TIROSINA EN POSICIÓN Y<sup>52</sup> DE *AN. STEPHENSI*, IMPLICADO EN LA ESTABILIZACIÓN DE TROMBOXANO A2..... 168
- FIGURA 51. ALINEAMIENTO NUCEOTÍDICO DE PROTEÍNAS SIMILARES A PpSP15 DE *P. PERNICIOSUS* DE ESPAÑA (PERSPA) Y *P. PERNICIOSUS* DE ITALIA (PERITA). EL CODÓN DE PARADA ANTERIOR SE MUESTRA ENCUADRADO EN ROJO..... 169
- FIGURA 52. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS CODIFICANTES DE PROTEÍNAS SIMILARES A PpSP15: *L. LONGIPALPIS* (LON), *L. INTERMEDIA* (INT), *L. AYACUCHENSIS* (AYA), *P. ARABICUS* (ARA), *P. ARIASI* (ARI), *P. PERNICIOSUS* DE ITALIA (PERITA), *P. PERNICIOSUS* DE ESPAÑA (PERSPA), *P. TOBBI* (TOB), *P. ARGENTIPES* (ARG), *P. DUBOSQI* (DUB), *P. PAPATASI* (PAP) Y *P. SERGENTI* (SER). (∅): CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA ENTRE PERSPA Y PERITA. (↓): CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DE LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN, EL AMINOÁCIDO AFECTADO APARECE POR UN CÍRCULO. (♠): RESIDUOS CONSERVADOS DE CISTEÍNA..... 170
- FIGURA 53. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS CODIFICANTES DE PROTEÍNAS AMARILLAS: *L. LONGIPALPIS* (LON), *L. INTERMEDIA* (INT), *L. AYACUCHENSIS* (AYA), *P. ARABICUS* (ARA), *P. ARIASI* (ARI), *P. PERNICIOSUS* DE ITALIA (PERITA), *P. PERNICIOSUS* DE ESPAÑA (PERSPA), *P. TOBBI* (TOB), *P. ARGENTIPES* (ARG), *P. DUBOSQI* (DUB), *P. PAPATASI* (PAP), *P. SERGENTI* (SER), *AN. GAMBIAE* (ANG) Y *D. MELANOGASTER* (DRO). (∅): CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA ENTRE PERSPA Y PERITA. (↓): CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DE LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN, EL AMINOÁCIDO AFECTADO APARECE RODEADO POR UN CÍRCULO. (♠): AMINOÁCIDOS IMPLICADOS EN EL SITIO DE UNIÓN A LIGANDO..... 171
- FIGURA 54. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS CODIFICANTES DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON PARSP25: *P. ARABICUS* (ARA), *P. ARIASI* (ARI), *P. PERNICIOSUS* DE ITALIA (PERITA), *P. PERNICIOSUS* DE ESPAÑA (PERSPA), *P. TOBBI* (TOB), *P. DUBOSQI* (DUB). (∅): CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA ENTRE PERSPA Y PERITA. (↓): CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DE LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN, EL AMINOÁCIDO AFECTADO APARECE RODEADO POR UN CÍRCULO. .... 172
- FIGURA 55. ALINEAMIENTO DE SP06 DE *P. PERNICIOSUS* DE ESPAÑA (PERSPA), ITALIA (PERITA) Y LUFAXINA DE *L. LONGIPALPIS* (LON). (∅) CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA ENTRE PERSPA Y PERITA. (↓): CAMBIOS EN LA PREDICCIÓN DE LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN, EL AMINOÁCIDO AFECTADO APARECE RODEADO POR UN CÍRCULO..... 173
- FIGURA 56. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS PROTEÍNAS SALIVALES. A) GENES SP08, SP03B Y SP01. B) SP01B. C) SP04 Y SP04B. M1 Y M2: MARCADORES DE PESO MOLECULAR DE 1 Kb Y 100 PB, RESPECTIVAMENTE (BIOTOOLS®)..... 174
- FIGURA 57. ANÁLISIS DE LOS CLONES RECOMBINANTES DE SP08 EN EL VECTOR PCR® 4-TOPO®, MEDIANTE PCR. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1 Kb (BIOTOOLS®). .... 174
- FIGURA 58. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (*BAMHI/SALI*) DE SP08 EN LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES PCR® 4-TOPO®. LA BANDA SUPERIOR CORRESPONDE AL VECTOR LINEALIZADO (3'9 Kb) Y LA INFERIOR A SP08. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1 Kb (BIOTOOLS®)..... 175
- FIGURA 59. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES. A) EXPRESIÓN DE LAS CÉLULAS M15 QUE CONTENÍAN EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE PQE31, A 37°C DURANTE 3 H O A 16°C DURANTE 16 H. B) EXPRESIÓN DE LAS CÉLULAS BL21 QUE CONTENÍAN EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE PGEX4T3, A 37°C DURANTE 3 H O A 16°C DURANTE 16 H. C) EXPRESIÓN DE LAS CÉLULAS *ARCTICEXPRESS* QUE CONTENÍAN EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE PGEX4T3, A 4°C DURANTE 24 H. CNI: 20 µL DE CULTIVO BACTERIANO NO INDUCIDO. CI: 20 µL DE CULTIVO INDUCIDO EN PRESENCIA DE 1 mM DE IPTG. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *PRECISION PLUS DUAL XTRA* (BIO-RAD®). .... 177

FIGURA 60. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RSP01B (37 kDA), RSP03B (45 kDA), RSP04 (29 kDA), RSP04B (21 kDA), RGST (26 kDA) Y RSP08 (28,5 kDA). CNI: 20 µL DE CULTIVO BACTERIANO NO INDUCIDO. CI: 20 µL DE CULTIVO INDUCIDO. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR <i>PRECISION PLUS DUAL XTRA</i> (BIO-RAD®). ....	178
FIGURA 61. ELUÍDOS E1 A E10 DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E INMUNODETECCIÓN DE LOS RESIDUOS DE HISTIDINA. A) RSP01B. B) RSP04. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR <i>PRECISION PLUS DUAL XTRA</i> (BIO-RAD®). ....	179
FIGURA 62. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES (RSP01B, RSP04, RSP08 Y RGST). CNI: 20 µL DE CULTIVO BACTERIANO NO INDUCIDO. CI: 20 µL DE CULTIVO INDUCIDO. PUR: 20 µL DE PROTEÍNA PURIFICADA. LAS FLECHAS ROJAS INDICAN LA PROTEÍNA PURIFICADA. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR <i>PRECISION PLUS DUAL XTRA</i> (BIO-RAD®). ....	180
FIGURA 63. NIVELES DE ANTICUERPOS IgG PRESENTES EN SUEROS DE RATONES <i>SKH</i> EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE UTILIZADA PARA TAPIZAR LAS PLACAS DE ELISA. A) PLACAS TAPIZADAS CON RSP01B; B) PLACAS TAPIZADAS CON RSP04; C) PLACAS TAPIZADAS CON RSP08; D) PLACAS TAPIZADAS CON RGST. ....	182
FIGURA 64. NIVELES DE ANTICUERPOS IgG FRENTE A LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RSP01B Y RSP04, PRESENTES EN SUEROS DE RATONES <i>SKH</i> , EN FUNCIÓN DEL AGENTE BLOQUEANTE. A) LECHE DESNATADA. B) BSA. ....	183
FIGURA 65. EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RSP01B, RSP04, RSP08 Y RGST COMO MARCADORES DE LA EXPOSICIÓN A LA PICADURA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> CON SUEROS DE RATONES <i>SKH</i> . (●) SUEROS DE RATONES NO EXPUESTOS A LOS FLEBOTOMOS. (●): SUEROS DE RATONES EXPUESTOS A LOS FLEBOTOMOS. ....	184
FIGURA 66. ESPECIFICIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> . NIVELES DE ANTICUERPOS IgG PRESENTES EN LOS SUEROS DE RATONES <i>SKH</i> NO INMUNIZADOS (NEG) O INMUNIZADOS CON LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> (PER), <i>P. SERGENTI</i> (SER), <i>P. PAPATASI</i> (PAP) Y <i>L. LONGIPALPIS</i> (LON). A) RSP01B. B) RSP04. C) RSP08 Y D) RGST. EL NIVEL DE ANTICUERPOS ESTÁ EXPRESADO COMO LA MEDIA DE LA DENSIDAD ÓPTICA DE DOS SUEROS HIPERINMUNES DE RATÓN. ....	185
FIGURA 67. EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES COMO MARCADORES DE EXPOSICIÓN EN PERROS. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES IgG ANTISALIVA (SGH) Y LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RSP01B (A). RSP04 (B); RSP08 (C) Y RGST (D). (●): SUEROS DE PERROS EXPUESTOS A LOS FLEBOTOMOS. (●) SUEROS DE PERROS NO EXPUESTOS A LOS FLEBOTOMOS. ....	186
FIGURA 68. RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> POR LOS SUEROS DE RATÓN, MEDIANTE WB. RSP01B: 1 µg/POCILLO; RSP04: 2 µg/POCILLO; RSP08: 2 µg/POCILLO; RGST: 1 µg/POCILLO. EL ÁREA DE LA MEMBRANA DE PVDF CORRESPONDIENTE A CADA POCILLO SE CORTÓ EN 4 PARTES QUE SE INCUBARON CON LOS DISTINTOS SUEROS DE RATONES <i>SKH</i> EXPUESTOS 4, 9 Y 25 VECES A LAS PICADURAS DE <i>P. PERNICIOSUS</i> . (-): CONTROL NEGATIVO (SUERO DE UN RATÓN NO EXPUESTO). M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR <i>BENCHMARK</i> (INVITROGEN®). ....	187
FIGURA 69. RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> POR LOS SUEROS DE PERRO, MEDIANTE WB. RSP01B: 1 µg/POCILLO; RSP04: 2 µg/POCILLO; RSP08: 2 µg/POCILLO; RGST: 1 µg/POCILLO. EL ÁREA DE LA MEMBRANA DE PVDF CORRESPONDIENTE A CADA POCILLO SE CORTÓ EN 4 PARTES QUE SE INCUBARON CON LOS SUEROS. (+) CONTROL POSITIVO (SUEROS DE PERROS EXPUESTOS EXPERIMENTALMENTE A LAS PICADURAS DE <i>P. PERNICIOSUS</i> ). (-): CONTROL NEGATIVO (SUERO DE UN PERRO NO EXPUESTO). M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR <i>BENCHMARK</i> (INVITROGEN®). ....	187
FIGURA 70. CINÉTICA DE ANTICUERPOS IgG FRENTE A RSP01B PRESENTES EN LOS SUEROS DE LOS RATONES BALB/C (PAUTA 3 DE INMUNIZACIÓN). NIVELES DE ANTICUERPOS EXPRESADOS EN: A) DO <sub>492</sub> . B) ÍNDICES. ....	189
FIGURA 71. CINÉTICA DE ANTICUERPOS IgG FRENTE A RSP04 PRESENTES EN LOS SUEROS DE LOS RATONES BALB/C (PAUTA 3 DE INMUNIZACIÓN). NIVELES DE ANTICUERPOS EXPRESADOS EN: A) DO <sub>492</sub> . B) ÍNDICES. ....	190

FIGURA 72. NIVELES DE ANTICUERPOS IgG ANTISALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> PRESENTES EN LOS SUEROS DE LIEBRES. (●)	
SUEROS DE LIEBRES NO EXPUESTAS A LAS PICADURAS. (●): SUEROS DE LIEBRES DE LA CM.....	193
FIGURA 73. NIVELES DE ANTICUERPOS IgG ANTISALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> PRESENTES EN LOS SUEROS DE CONEJOS SILVESTRES. (●) SUEROS DE CONEJOS NO EXPUESTOS A LAS PICADURAS. (●): SUEROS DE LOS CONEJOS CAPTURADOS DURANTE 2011/2012. (●): SUEROS DE LOS CONEJOS CAPTURADOS DURANTE 2013. ....	194
FIGURA 74. RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> (SGH) POR LOS SUEROS DE LOS LEPÓRIDOS, MEDIANTE WB. A) SUEROS DE LIEBRES (CARRILES 1-3). (C-) CONTROL NEGATIVO (SUERO DE UNA LIEBRE DE ZONA NO ENDÉMICA, REPÚBLICA CHECA). B) SUEROS DE CONEJOS (CARRILES 4-5). (C-): CONTROL NEGATIVO (SUERO DE UN CONEJO DE ESTABULARIO). (C+): CONTROL POSITIVO DE EXPOSICIÓN (SUERO DE UN CONEJO EXPERIMENTALMENTE EXPUESTO A LA PICADURA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> ). ....	195
FIGURA 75. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgG, MEDIANTE ELISA, FRENTE AL EXTRACTO SALIVAL Y A LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RSP03B Y RSP01B, DETECTADOS EN LOS SUEROS DE LOS LEPÓRIDOS. A) LIEBRES. B) CONEJOS.....	196
FIGURA 76. RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RSP03B Y RSP01B POR LOS SUEROS DE LOS LEPÓRIDOS, MEDIANTE WB. A) SUEROS DE LIEBRES (CARRILES 1-3). (C-): CONTROL NEGATIVO (SUERO DE LIEBRE DE ZONA NO ENDÉMICA, REPÚBLICA CHECA). B) SUEROS DE CONEJOS (CARRILES 4-5). (C-): CONTROL NEGATIVO (SUERO DE CONEJO DE ESTABULARIO). (C+): CONTROL POSITIVO (SUERO DE UN CONEJO EXPERIMENTALMENTE EXPUESTO A LA PICADURA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> ). ....	197
FIGURA 77. NIVELES DE ANTICUERPOS IgG ANTISALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> , MEDIANTE ELISA, PRESENTES EN LOS SUEROS DE LOS PERROS CON PROPIETARIO, RESIDENTES EN EL SUROESTE DE LA CM. (●): SUEROS DE PERROS NO EXPUESTOS A LAS PICADURAS. (●): SUEROS DE PERROS DE LA CM. ....	198
FIGURA 78. NIVELES DE ANTICUERPOS IgG ANTISALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> PRESENTES EN LOS SUEROS DE LOS PERROS CON PROPIETARIO RESIDENTES EN EL SUROESTE DE LA CM. (●): SUEROS DE PERROS NO EXPUESTOS A LAS PICADURAS. (●): GRUPO 1: PERROS CON UN BAJO NIVEL DE EXPOSICIÓN A LOS FLEBOTOMOS. (●): GRUPO 2: PERROS CON UN ELEVADO NIVEL DE EXPOSICIÓN A LOS FLEBOTOMOS. ....	199
FIGURA 79. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgG DETECTADOS EN LOS SUEROS DE PERROS, MEDIANTE ELISA, FRENTE AL EXTRACTO SALIVAL Y LA PROTEÍNA RECOMBINANTE RSP03B.....	199





## 8.2 Lista de tablas

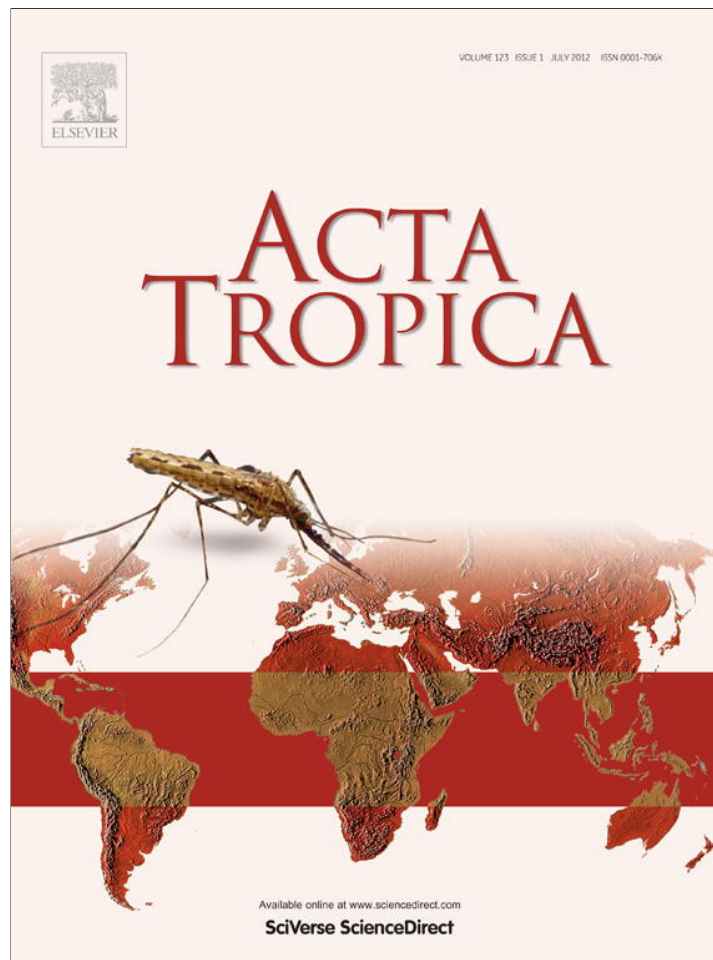
TABLA 1. POSICIÓN TAXONÓMICA DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> (CAVALIER-SMITH, 1998).....	14
TABLA 2. PROTEÍNAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> (ANDERSON Y COL., 2006).....	64
TABLA 3. RECOPIACIÓN DE TRABAJOS SOBRE EL EFECTO PROTECTOR DE LA SALIVA DE LOS FLEBOTOMOS FRENTE A LA LEISHMANIOSIS.....	71
TABLA 4. PROTEÍNAS DE LA SALIVA DE LOS FLEBOTOMOS ENSAYADAS COMO VACUNAS FRENTE A LA LEISHMANIOSIS EN MODELOS <i>IN VIVO</i> . ....	74
TABLA 5. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DEFINIDOS UTILIZADOS EN EL MANTENIMIENTO DE LAS BACTERIAS.....	89
TABLA 6. PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA.....	92
TABLA 7. SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA PREPARACIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA. ....	93
TABLA 8. SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON PLATA .....	95
TABLA 9. SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON AZUL DE COOMASSIE COLOIDAL.....	96
TABLA 10. COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES REQUERIDAS EN EL MANTENIMIENTO DE LOS FAGOS. ....	105
TABLA 11. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE ADNc A PARTIR DE LOS FAGOS RECOMBINANTES .....	107
TABLA 12. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE PCR DE LOS CLONES BACTERIANOS RECOMBINANTES.....	108
TABLA 13. CEBADORES EMPLEADOS EN LA SECUENCIACIÓN.....	110
TABLA 14. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES A PARTIR DEL CORRESPONDIENTE PLÁSMIDO RECOMBINANTE pTRIPLEX2. ....	112
TABLA 15. CEBADORES UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES A PARTIR DE LA GENOTECA. ....	113
TABLA 16. PAREJAS DE CEBADORES EMPLEADAS EN LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES PARA LA INTRODUCCIÓN DE LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN*.....	115
TABLA 17. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EL VECTOR PQE31. ....	119
TABLA 18. DIÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES. ....	121
TABLA 19. CONDICIONES DEL ELISA <i>IN HOUSE</i> PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTISALIVA ESTABLECIDAS EN LA UEM (ISCIII).....	125
TABLA 20. CLASIFICACIÓN DE LOS PERROS SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO DE ACUERDO A SU POTENCIAL EXPOSICIÓN A LA PICADURA DE LOS FLEBOTOMOS.....	126
TABLA 21. PROTEÍNAS DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> IDENTIFICADAS MEDIANTE MALDI-TOF/TOF.....	136
TABLA 22. PREDICCIÓN <i>IN SILICO</i> DE LOS SITIOS DE GLICOSILACIÓN Y DE FOSFORILACIÓN EN LAS PROTEÍNAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> IDENTIFICADAS. ....	142

TABLA 23. NÚMERO DE FLEBOTOMOS ALIMENTADOS SOBRE RATONES Y CRICETOS EN LAS DISTINTAS PAUTAS DE INMUNIZACIÓN CON LA SALIVA DE <i>P. PERNICIOSUS</i> A TRAVÉS DE LA PICADURA. ....	144
TABLA 24. NÚMERO DE PICADURAS ACUMULADAS EN LOS RATONES EN CADA PROCESO DE INMUNIZACIÓN Y MORTALIDAD DE LOS FLEBOTOMOS ALIMENTADOS. ....	145
TABLA 25. NÚMERO DE PICADURAS ACUMULADAS EN LOS CRICETOS EN CADA PROCESO DE INMUNIZACIÓN Y MORTALIDAD DE LOS FLEBOTOMOS ALIMENTADOS. ....	145
TABLA 26. RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE PICADURAS ACUMULADAS POR CADA GRUPO DE ANIMALES Y LA MORTALIDAD DE LOS FLEBOTOMOS ALIMENTADOS SOBRE DICHO GRUPO ANALIZADA CON EL TEST NO PARAMÉTRICO DE SPEARMAN. ....	146
TABLA 27. DIFERENCIAS EN INTENSIDAD DEL RECONOCIMIENTO DE LOS ANTÍGENOS SALIVALES. ....	148
TABLA 28. FLEBOTOMOS ALIMENTADOS SOBRE CADA RATÓN, INMUNIZADOS MEDIANTE LA PAUTA 3. ....	149
TABLA 29. FLEBOTOMOS ALIMENTADOS SOBRE CADA CONEJO. ....	153
TABLA 30. NÚMERO DE PICADURAS ACUMULADAS EN LOS CONEJOS EN CADA PROCESO DE INMUNIZACIÓN Y MORTALIDAD DE LOS FLEBOTOMOS ALIMENTADOS. ....	156
TABLA 31. TÍTULO Y PORCENTAJE DE CLONES NO RECOMBINANTES EN LAS GENOTECAS DE EXPRESIÓN. ....	160
TABLA 32. TRÁNSCRITOS AISLADOS DE LA GENOTECA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> . ....	161
TABLA 33. INFORMACIÓN DETALLADA DE LOS TRÁNSCRITOS AISLADOS DE LA GENOTECA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> . ....	162
TABLA 34. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS ENTRE LOS ADNc COMPLETOS SECUENCIADOS DE LA GENOTECA DE GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> Y LAS SECUENCIAS PREVIAMENTE ANOTADAS EN LAS BASES DE DATOS (ANDERSON Y COL., 2006). ....	165
TABLA 35. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS SALIVALES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> . ....	178
TABLA 36. NIVELES DE ANTICUERPOS FRENTE A LA SALIVA Y PROTEÍNAS RECOMBINANTES PRESENTES EN LOS SUEROS DE LOS CUATRO RATONES (R1 A R4) Y Nº DE PICADURAS EN CADA INMUNIZACIÓN. ....	191
TABLA 37. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE IgG FRENTE A LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RSP01B Y RSP04 Y EL NÚMERO DE PICADURAS RECIBIDAS POR CADA RATÓN DURANTE LA FASE DE INMUNIZACIÓN. ....	192
TABLA 38. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS FRENTE A SGH Y LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES, UTILIZANDO LOS SUEROS DE RATONES (PAUTA 3). ....	192

### 8.3 Publicaciones

1. **Martín-Martín, I.**, Molina, R., Jiménez, M., 2012. An insight into the *Phlebotomus perniciosus* saliva by a proteomic approach. *Acta Trop* **123**, 22-30.
2. Molina, R., Jimenez, M.I., Cruz I., Iriso, A., **Martin-Martin, I.**, Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* **190**, 268-271.
3. **Martín-Martín, I.**, Molina, R., Jiménez, M., 2013. Identifying salivary antigens of *Phlebotomus argentipes* by a 2DE approach. *Acta Trop* **126**, 229-239.
4. **Martín-Martín, I.**, Molina R., Jiménez M., 2013. Molecular and immunogenic properties of apyrase SP01B and D7-related SP04 recombinant salivary proteins of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid, Spain. *BioMed Res Int*, vol. 2013, Article ID 526069, 14 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/526069>.
5. Drahota, J\*, **Martín-Martín, I\***, Sumová, P., Rohoušová, I., Jiménez, M., Molina, R., Volf, P., 2014. Recombinant antigens from *Phlebotomus perniciosus* saliva as markers of canine exposure to visceral leishmaniasis vector. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2597.  
\* **Estos autores han contribuido de forma igualitaria en la realización del trabajo.**
6. **Martín-Martín, I.**, Molina, R., Rohoušová, I., Drahota, J., Volf, P., Jiménez, M., 2014. High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniasis focus in Madrid, Spain. *Vet Parasitol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.1002.1045>.
7. Jiménez, M., González, E., **Martín-Martín, I.**, Hernández, S., Molina, R., 2014. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027>.





This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)

# An insight into the *Phlebotomus perniciosus* saliva by a proteomic approach

Inés Martín-Martín, Ricardo Molina\*, Maribel Jiménez\*

Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220, Majadahonda, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 21 October 2011

Received in revised form 5 March 2012

Accepted 7 March 2012

Available online 16 March 2012

### Keywords:

*Phlebotomus perniciosus*

Sand fly

Salivary proteins

Leishmaniasis

Proteomics

Two-dimensional electrophoresis

## ABSTRACT

Sand fly saliva is known to play an important role in the establishment of *Leishmania* spp. infection. As a consequence, identifying antigenic salivary proteins of different leishmaniasis vectors has currently become a major task in the field of anti-*Leishmania* vaccine development. The purpose of this work was to improve the knowledge of *Phlebotomus perniciosus* salivary proteins by combining two-dimensional gel electrophoresis (2DE) methodology, mass spectrometry and Western blotting (WB). Salivary protein profiles of three *P. perniciosus* colonies from different geographic origins in Spain were compared through SDS-PAGE, leading to a similar pattern with no qualitatively noticeable differences. A gradual increase of the protein content was significantly detected with the age of sand flies, reaching the complete salivary protein profiles at day four. The 2DE revealed a reproducible protein profile that matched the classic monodimensional SDS-PAGE pattern (1DE). More spots rather than protein bands (19 versus 11) were visualized by 2DE and 1DE, respectively, suggesting the presence of either protein isoforms or posttranslational modifications. Sera of mice and hamsters immunized through exposure to sand fly bites following different immunization schedules showed elevated anti-saliva IgG levels. These sera allowed the detection of 5 bands and 16 immunogenic spots in 1DE and 2DE, respectively, followed by WB. These antigens were identified by MALDI-TOF/TOF as SP03, SP03B, SP08, SP01, SP01B, SP04, SP04B, SP02, *Phlebotomus ariasi* SP16, and *Phlebotomus argentipes* SP13. This work is assumed to be the first attempt to establish 2DE proteomic maps of *P. perniciosus* saliva. All spots were identified as salivary proteins, confirming this technology as an interesting tool to improve sand fly salivary knowledge.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Leishmaniasis is still considered one of the most neglected diseases; however, 2 million new cases occur worldwide each year (WHO, 2010). It is caused by several species of the genus *Leishmania* spp. which are transmitted to humans through the bite of infected phlebotomine sand flies. These bloodsucking insects need to acquire vertebrate blood to promote egg development. Blood feeding is a complex process in which arthropods insert their mouthparts into the vertebrate skin to obtain blood from them. During this process, saliva is injected at the site of the bite. Insect saliva facilitates blood meal acquisition through pharmacologically active compounds that prevent host haemostatic and immune responses (Ribeiro, 1987a). Consequently, arthropod saliva has evolved in such a way to support blood feeding success. Vector borne pathogens take advantage of the salivary properties of their vectors in order to enhance their transmission (Ribeiro, 1987b). During an infective bite, sand fly saliva is injected along with *Leishmania* spp. metacyclic promastigotes and it is known to

play an important role in host infection establishment (Rohousova and Volf, 2006). Sand fly saliva particularly enhances transmission of *Leishmania* spp. (Titus and Ribeiro, 1988; Samuelson et al., 1991; Theodos et al., 1991). These enhancing effects on leishmaniasis onset are linked to its ability to modulate both the innate and acquired immune responses (Kamhawi, 2000; Rogers and Titus, 2003; Rohousova and Volf, 2006). On the other hand, pre-exposure to non-infected sand fly bites or immunization against either salivary gland homogenate (SGH) or specific salivary proteins results in humoral and/or cellular responses that lead to protection against the establishment of infection (Kamhawi et al., 2000; Valenzuela et al., 2001; Gomes et al., 2008; Collin et al., 2009). As a consequence, identifying antigenic salivary proteins of different leishmaniasis vectors has currently become a major task in the field of anti-*Leishmania* vaccine development.

Proteomics, one of the most important areas of research in the post-genomic area, is being used to address several unanswered questions related to microbial pathogens. *Leishmania* proteome has been extensively studied, leading to the identification of virulence factors, antigens, proteins involved in drug resistance, and species and stage specific proteins (Thiel and Bruchhaus, 2001; Góngora et al., 2003; Dea-Ayuela et al., 2006; Sharma et al., 2009; Yao et al., 2010). Proteomic techniques have also been of great value in the

\* Corresponding author. Tel.: +34 918223674; fax: +34 915097034.

E-mail addresses: [rmolina@isciii.es](mailto:rmolina@isciii.es) (R. Molina), [mjimenez@isciii.es](mailto:mjimenez@isciii.es) (M. Jiménez).

field of medical entomology. This methodology has enabled the identification of proteins implicated in vector-pathogen interaction (Rachinsky et al., 2008; Chen et al., 2011; Serrano-Pinto et al., 2011) as well as many salivary proteins of mainly ticks and mosquitoes (Kalume et al., 2005; Choumet et al., 2007; Oleaga et al., 2007; Rachinsky et al., 2008; Wasinpiyamongkol et al., 2009; Kongsuwan et al., 2011). To date, all immunogenic sand fly salivary proteins have been identified by 1DE separation followed by WB (Valenzuela et al., 2001; Volf and Rohousova, 2001; Bahia et al., 2007; Drahota et al., 2009; Marzouki et al., 2011; Vlkova et al., 2011). However, a 2DE approach has not yet been applied to the field of sand fly salivary protein analysis, and it could be helpful in expanding the protein repertoire knowledge in order to select the best vaccine candidates (Kumari et al., 2008).

In this study, saliva of *Phlebotomus perniciosus*, the most widespread vector of *Leishmania infantum* to humans and dogs in the western Mediterranean Basin, was analyzed by a 2DE approach for the first time. Furthermore, a combination of 2DE, mass spectrometry and WB was used to identify specific immunogenic proteins.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sand flies and preparation of salivary gland homogenate (SGH)

Three *P. perniciosus* colonies from different areas of Spain (Zaragoza, Valencia and Madrid) are routinely maintained at 27 °C and a 17:7 light–darkness photoperiod at the Medical Entomology Unit of the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain. The colonies from Zaragoza (kindly supplied by Dr. Javier Lucientes), Valencia and Madrid were used for the comparison of salivary protein profiles of different geographic origin. The *P. perniciosus* colony from Madrid was used for age dependence, proteomic and immunological studies. This colony was established from sand flies captured at a leishmaniasis endemic area in Madrid (Molina, 1991).

Salivary glands were dissected from 4- to 8-day-old adult female flies. Exceptionally, glands were dissected from 1- to 8-day-old sand flies for age dependence analysis. Glands were stored in Tris 5 mM, usually in groups of 20 salivary glands in 10 µl of Tris buffer, for proteome analysis. Glands were dissected and stored in PBS for ELISA tests. Vials containing the salivary glands were frozen immediately after dissection and kept at –80 °C until needed.

The SGH for ELISA and SDS-PAGE was prepared by sonication (Labsonic, Sartorius, Goettigen, Germany). For proteomics, glands were treated with lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS and 40 mM Tris, Bio-Rad, Hercules, CA) in the presence of 1% protease inhibitor (Amersham, Piscataway, NJ). After 2 h incubation, the SGH was centrifuged at 10,000 × g for 5 min to remove insoluble material.

### 2.2. One-dimensional electrophoresis

The protein contents of 40 salivary glands were separated by 1DE on 15% discontinuous gels under reducing conditions (Laemmli, 1970). The contents of 15–40 salivary glands were loaded into each lane and electrophoresis was performed. Gels were run at 200 V at 15 °C using the Criterion Dodeca Cell (Bio-Rad, Hercules, CA) until the tracking dye reached the end-point.

### 2.3. Proteomic analysis

The equivalent protein of 60–150 salivary glands was submitted to isoelectric focusing (IEF). Protein samples were diluted to a final volume of 200 µl in rehydration solution (DeStreak solution, Amersham, Piscataway, NJ, 1% ampholytes, Bio-Rad, Hercules,

CA) and loaded into 11 cm IPG-strips of different pH ranges (3–10, 4–7 and 7–10; Bio-Rad, Hercules, CA). All IEF procedures were performed in a Protean IEF cell (Bio-Rad, Hercules, CA) under a maximum current of 50 µA/strip and a constant temperature of 20 °C. The IEF conditions were as follows: 20 min 250 V, 2 h 50 min 8000 V and a final phase run until 20,000 Vh was reached. IPG strip equilibration was carried out by a two step process. Firstly, proteins were reduced (20 mg/ml DTT) and then alkylated (25 mg/ml iodoacetamide) in equilibration buffer (6 M urea, 50 mM Tris–Cl pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue). Equilibrated strips were applied to 15% polyacrylamide gels (Criterion Cassettes, Bio-Rad, Hercules, CA) and sealed with overlay agarose (Bio-Rad, Hercules, CA). Gels were run at 200 V at 15 °C using the criterion dodeca cell (Bio-Rad, Hercules, CA) until the tracking dye reached the end-point. Protein spots were visualized by compatible MS silver staining and gels were scanned in a GS800 densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA). At least three independent experiments were performed for each condition analyzed generating reproducible results.

### 2.4. In-gel trypsin digestion

Silver stained protein spots were excised from the gels manually and submitted to MS analyses, which were carried out at the National Centre for Cardiovascular Research (CNIC, Madrid, Spain). Protein samples were digested automatically using a Proteiner DP robot (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) under the control of dpControl 1.2 software (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), according to the protocol of Shevchenko et al. (1996) with minor modifications: gel plugs were submitted to reduction with 10 mM DTT and alkylation with 55 mM iodoacetamide, both in 50 mM ammonium bicarbonate. The gel pieces were then rinsed with 50 mM ammonium bicarbonate and acetonitrile and dried under a stream of nitrogen. Modified porcine trypsin at a final concentration of 8 ng/µl in 50 mM ammonium bicarbonate was added to the dry gel pieces and the digestion proceeded at 37 °C for 8 h. Finally, 0.5% trifluoroacetic acid was added for peptide extraction.

### 2.5. Mass spectrometry and database searching

MALDI samples were prepared by mixing equal volumes of the above digestion solution and a matrix solution composed of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) in 50% aqueous acetonitrile and 0.25% trifluoroacetic acid. This mixture was deposited onto a 600 µm AnchorChip prestructured MALDI probe (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) and allowed to dry at room temperature. Samples were automatically analyzed in an Ultraflex MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) with an automated analysis loop using internal mass calibration, under the control of flexControl 2.2 software (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Automated analysis of mass data was performed using the flexAnalysis 2.2 software (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). MALDI-MS and MS/MS spectra were manually inspected in detail and reacquired, recalibrated and/or relabeled when necessary using the programs above as well as homemade software. MALDI-MS and MS/MS data were combined through the BioTools 3.0 program (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) to search a non-redundant protein database (NCBIInr; ~10<sup>7</sup> entries; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, US; or SwissProt; ~5 × 10<sup>5</sup> entries; Swiss Institute for Bioinformatics, Switzerland) using the Mascot software (Matrix Science, London, UK). Additionally, sequenced peptides were compared with virtual translations of the Expressed Sequenced Tags database of *Lutzomyia longipalpis* deposited at the



Sanger Institute (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Lutzomyia>). Although, this search did not result in any new identification.

## 2.6. Sera

Balb/c mice and Syrian golden hamsters were housed at the animal facilities in the ISCIII. Animal handling was carried out according to the standards specified in the guide for care and use of laboratory animals and approved by ethics committees for animal care and experimentation. Animals were anaesthetized (ketamine 150 mg/kg and xylazine 15 mg/kg intraperitoneally and ketamine 150 mg/kg intramuscularly, for mice and hamsters, respectively) and individually exposed to sand fly females according to different immunization schedules. Balb/c mice were exposed to about 50–100 female sand flies, either once a week, over 10 weeks or twice a week over three weeks (Schedules 1 and 2, respectively). Hamsters were immunized through the bites of 50–100 sand flies once a week over 10 weeks. Engorged sand flies were counted for each animal after each immunization experiment. Animals were bled by intracardiac puncture one week after the last exposure and pooled sera were used in the experiments. Control sera were obtained from non-immunized animals.

## 2.7. ELISA

Specific anti-saliva IgG antibody response generated by the immunized animals was measured by direct ELISA, according to Rohousova et al. (2005) with minor modifications. Briefly, microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with SGH (10 pairs of salivary glands/mL) in carbonate buffer (NaHCO<sub>3</sub> 28 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM; pH 9.6) overnight at 4 °C. The plates were blocked with 1% BSA in 0.3% PBS-Tween at 37 °C for 45 min. After five washes with 0.1% PBS-T, mice, hamster and control pooled sera (1:50) were incubated overnight at 4 °C. After further washings, goat anti-hamster IgG (1:4000, Southern Biotech, Birmingham, AL) and goat anti-mouse IgG (1:500, AbD Serotec, Oxford, UK) peroxidase-conjugated antibodies were incubated for 45 min at 37 °C. Following another washing cycle, the plates were developed with ABTS (Sigma, St. Louis, CA) according to the manufacture instructions. The absorbance was measured at 405 nm using an ELISA reader (ELx800, BioTek, Winooski, VT). Each serum was tested in duplicate. The control wells were coated with SGH, but no serum was added. IgG antibody levels are reported as adjusted OD (aOD), calculated for each serum as a mean OD value of three different experiments minus the OD value of the control

wells. The non-parametric Mann–Whitney *U* test was performed for statistical analysis, using Prism version 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Statistical significance was considered when the *p*-value was <0.05.

## 2.8. Western blot analysis

After 1DE and 2DE, the gels were electroblotted onto a PVDF membrane and incubated overnight in blocking buffer (3% BSA, Sigma, St. Louis, CA; 2% ECL Blocking reagent, Amersham, Piscataway, NJ). After three washes with 0.5% PBS-T, the membranes were incubated overnight with mice, hamster and control diluted pooled sera (1:25) at 4 °C. After washing, the membranes were incubated with goat anti-hamster IgG (1:3500, Southern Biotech, Birmingham, AL) and goat anti-mouse IgG (1:1000, AbD Serotec, Oxford, UK) peroxidase-conjugated antibodies for 1 h at room temperature. Immunogenic proteins were visualized by Metal Enhanced DAB reagent following the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, Goettigen, Germany).

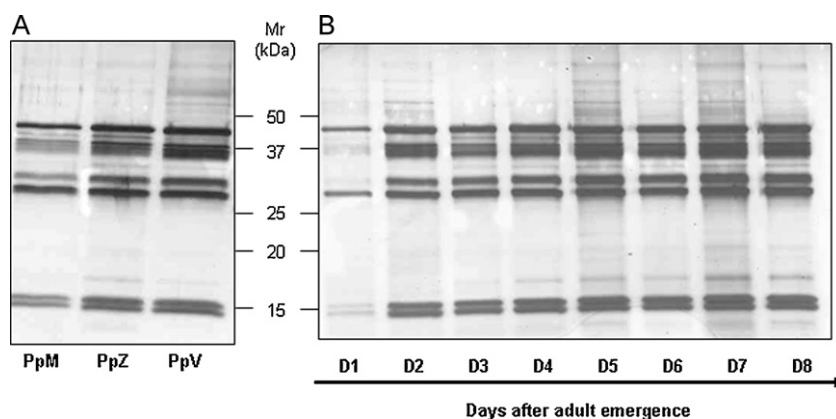
## 3. Results

### 3.1. 1DE analysis of *P. perniciosus* saliva

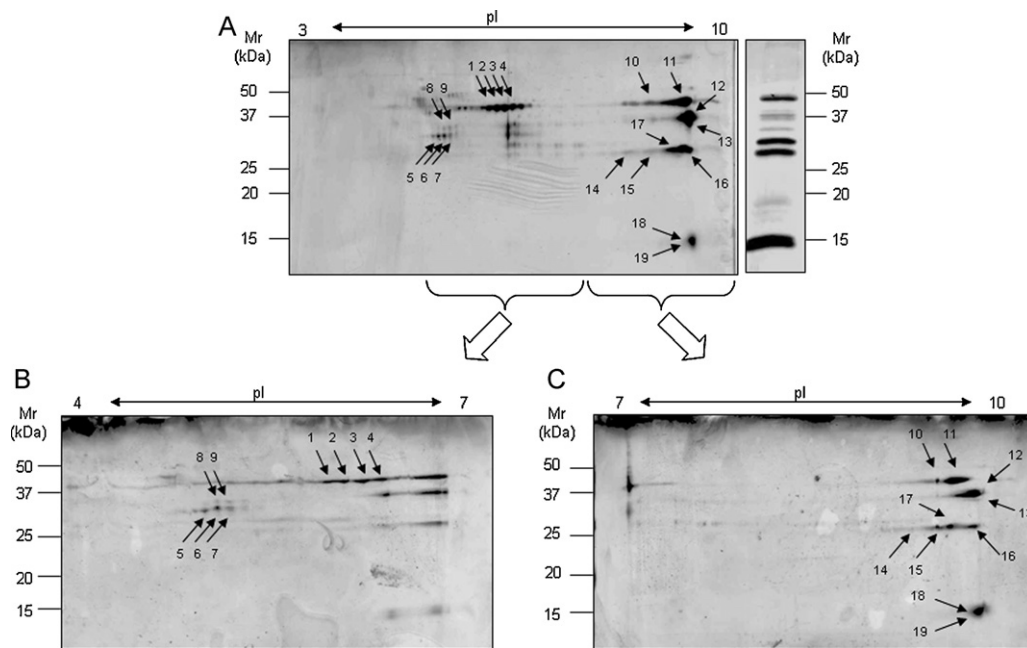
Analysis of the salivary gland contents of the three *P. perniciosus* colonies from different geographic origins led to a similar protein profile, as shown in Fig. 1A. This pattern consisted of at least 10 protein bands which were mostly distributed between 25 and 50 kDa and around 15 kDa. The *P. perniciosus* colony from Madrid was used for further proteomic and immunologic studies. For this colony, salivary gland contents gradually increased with the age of the sand flies. The complete profile was reached at day four (Fig. 1B), and subsequently, glands were dissected from 4- to 8-day-old female flies to ensure the best source of saliva in terms of protein quantity.

### 3.2. Analysis of *P. perniciosus* proteome

As far as 2DE is concerned, SGH of *P. perniciosus* was first resolved into IPG strips of pH range 3–10. The protein spots observed in the 2DE gels matched the protein bands found in the 1DE profile. Silver staining revealed at least 25 spots which shared the molecular weight distribution with the 1DE profile (Fig. 2A). Moreover, the proteomic analysis showed two protein clusters according to their *pI*. Most of the protein spots appeared around pH 9, while the other set of proteins were found between pH 4 and 6. In order to



**Fig. 1.** Salivary protein profile of *P. perniciosus* saliva according to origin and age dependence analysis. SGH of 15 salivary glands was loaded per lane. Molecular weight markers in kDa are indicated. (A) Salivary protein profile of three sand fly colonies from different geographical origins in Spain: Madrid (PpM), Zaragoza (PpZ) and Valencia (PpV). (B) *P. perniciosus* (Madrid) salivary proteins according to the age of females (1 to 8 days after adult emergence).



**Fig. 2.** 2DE maps of *P. perniciosus* salivary proteins. (A) 1DE protein profile (15 glands) matched the molecular weight distribution of 2DE (60 glands per IPG strip pH 3–10). (B) Extract from 60 salivary glands separated using strips of pH 4–7. (C) Extract from 60 salivary glands separated using strips of pH 7–10. Molecular weight markers in kDa are indicated. Spots numbers on gels correspond to those specified in Table 1.

achieve better resolution of the areas where most of the spots were present, SGH was separated onto IPG strips of pH 4–7 and 7–10 (Fig. 2B and C, respectively). All the replicates performed for each condition showed similar protein spot patterns ensuring technique reproducibility.

A total of 19 spots were excised leading to the identification of 10 sand fly salivary proteins (Table 1): two yellow proteins (spots nos. 1–4, 10 and 11), two apyrases (spots nos. 12 and 13), three D7-related proteins (spots nos. 14–17), two PpSP15-like proteins (spots nos. 18 and 19) and one unknown protein family (spots nos. 5–9). Spot numbers on Table 1 correspond to those highlighted in Fig. 2. Peptide mass fingerprints of spots nos. 1–4 were identical to one another and were identified as SP03 (ABA43049). These four spots were found in the gel at 44 kDa of experimental molecular weight, but they slightly differed in pI, suggesting the presence of isoforms or posttranslational modifications. This phenomenon was also observed in spots nos. 10 and 11 (SP03B, ABA43050). Both proteins belong to the yellow protein family, which is known to be abundant within phlebotomine sialomes (Ribeiro et al., 2010). Similarly, SP08 (ABA43056) was identified in five adjacent spots, nos. 5–9, which faintly diverged in molecular weight and pI. Indeed, *Phlebotomus ariasi* SP16, which belongs to the multigenic D7-related family (Valenzuela et al., 2002), was also found in spots nos. 14 and 15.

As a significant finding, two salivary proteins belonging to other phlebotomine species were identified as the best match in *P. perniciosus* proteome. BLAST analyses of the proteins identified were performed to elucidate how diverged these sequenced peptides were from their related *P. perniciosus* salivary proteins. *P. ariasi* SP16 (spots nos. 14 and 15) shares a 74% identity with its closest *P. perniciosus* protein, SP04. Nevertheless, only 3% of the amino acids sequenced between these two proteins were non-coincident. Similarly, *Phlebotomus argentipes* SP13 (spot no. 19) showed a 56% identity with *P. perniciosus* SP09. Specifically, 42% of the 12 amino acids sequenced that led to the identification of that protein did not match the corresponding SP09.

### 3.3. ELISA

Immunized animal groups showed significantly higher anti-*P. perniciosus* saliva IgG levels than non-immunized animals ( $p < 0.01$ ). Repeatedly exposed mice of Schedule 1 produced higher antibody levels (mean aOD  $\pm$  standard deviation:  $0.87 \pm 0.16$ ) than sera of mice of Schedule 2 ( $0.36 \pm 0.06$ ) in contrast to non-exposed mice ( $0.09 \pm 0.008$ , Fig. 3A) as expected for the difference in sand fly bites both groups received (Fig. 3B). Hamster pooled sera also exhibited an elevated anti-saliva IgG level ( $0.95 \pm 0.19$ ) when compared to control individuals ( $0.040 \pm 0.040$ , Fig. 3A) according to the total bites they received.

### 3.4. Antigenic proteins

Several salivary proteins were recognized by sera of immunized animals exposed to *P. perniciosus* bites, as expected by the high antibody levels they showed in ELISA tests. As shown in Fig. 4A, hamster sera revealed at least 6 immunoreactive bands in 1DE and 16 spots in 2DE that correspond to specified spots in Table 1.

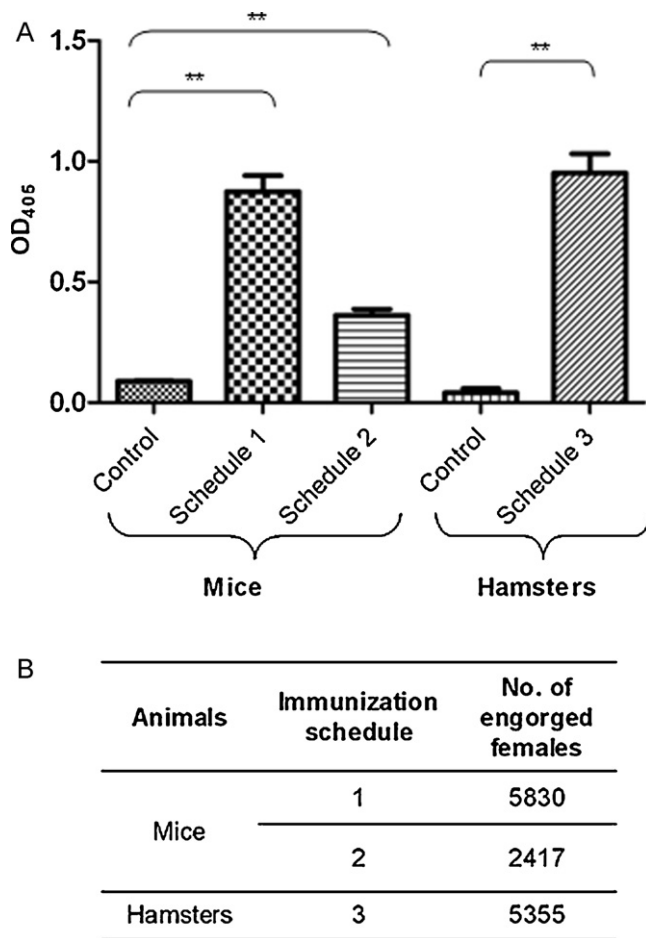
Only mice pooled sera of immunization Schedule 1 were used for WB since its anti-saliva IgG level was higher than immunization Schedule 2. Sera of mice recognized at least three bands and eleven spots after WB of 1D and 2D gels, respectively (Fig. 4B). Mice sera recognized SP03 (spots nos. 2 and 3), SP03B (spot no. 11), SP08 (spots nos. 5–9), SP01 (spot no. 12), SP01B (spot no. 13) and SP04B (spot no. 17) as seen in Table 1. However, there were several differences in the intensity of the reactions by hamsters and mice antibodies. Hamster sera strongly recognized several spots of the yellow protein SP03 (spots nos. 1–4) whereas mice sera faintly reacted with two spots of the SP03 series (spots nos. 2 and 3). Both sera yielded a high recognition to the unknown function SP08 (spots nos. 5–9). However, apyrases (spots nos. 12 and 13) were mostly recognized by mice sera rather than hamster sera. On the other hand, D7-related proteins (spots nos. 14–16) were only highlighted as antigens by hamster sera.

**Table 1**  
*Phlebotomus perniciosus* salivary proteins identified by MALDI-TOF/TOF.

Spot no.	NCBI accession no.	Protein name	Mass (kDa) (Exp/Theo)	pI (Exp/Theo)	Matched peptides	Coverage (%)	MASCOT score <sup>a</sup>	Predicted phosphorylation sites <sup>b</sup>			Protein family
								Ser	Thr	Tyr	
1	ABA43049	SP03 [ <i>P. perniciosus</i> ]	44.000	6.20	5.91	10	329	16	7	4	Yellow protein
2	ABA43049	SP03 [ <i>P. perniciosus</i> ]	44.000	6.38	5.91	19	659	16	7	4	Yellow protein
3	ABA43049	SP03 [ <i>P. perniciosus</i> ]	44.000	6.50	5.91	13	337	16	7	4	Yellow protein
4	ABA43049	SP03 [ <i>P. perniciosus</i> ]	44.000	6.62	5.91	22	519	16	7	4	Yellow protein
5	ABA43056	SP08 [ <i>P. perniciosus</i> ]	35.000	5.33	4.93	7	136	9	0	12	Unknown
6	ABA43056	SP08 [ <i>P. perniciosus</i> ]	35.000	5.45	4.93	7	188	9	0	12	Unknown
7	ABA43056	SP08 [ <i>P. perniciosus</i> ]	35.000	5.56	4.93	10	238	9	0	12	Unknown
8	ABA43056	SP08 [ <i>P. perniciosus</i> ]	37.000	5.45	4.93	6	117	9	0	12	Unknown
9	ABA43056	SP08 [ <i>P. perniciosus</i> ]	37.000	5.56	4.93	7	129	9	0	12	Unknown
10	ABA43050	SP03B [ <i>P. perniciosus</i> ]	44.000	9.59	8.81	6	110	15	6	5	Yellow protein
11	ABA43050	SP03B [ <i>P. perniciosus</i> ]	44.000	9.55	8.81	12	322	15	6	5	Yellow protein
12	ABB00906	SP01 [ <i>P. perniciosus</i> ]	36.000	9.59	9.14	11	132	5	5	10	Apyrase
13	ABB00907	SP01B [ <i>P. perniciosus</i> ]	34.000	9.88	8.82	8	202	5	2	7	Apyrase
14	AA55660	SP16 [ <i>P. ariasi</i> ]	29.000	8.95	7.46	5	97	6	4	3	D7-related protein
15	AA55660	SP16 [ <i>P. ariasi</i> ]	29.000	9.20	7.46	4	179	6	4	3	D7-related protein
16	ABA43051	SP04 [ <i>P. perniciosus</i> ]	29.000	9.50	8.41	5	156	2	3	3	D7-related protein
17	ABA43052	SP04B [ <i>P. perniciosus</i> ]	29.000	8.34	8.81	13	337	7	3	5	D7-related protein
18	ABA43048	SP02 [ <i>P. perniciosus</i> ]	17.000	9.50	9.18	1	93	4	1	2	PpSP15-like protein
19	ABA12144	SP13 [ <i>P. argentipes</i> ]	17.000	9.50	8.70	1	86	3	1	4	PpSP15-like protein

<sup>a</sup> MASCOT scores above 50 indicate significant identity or extensive homology.

<sup>b</sup> Phosphorylation sites prediction performed with NetPhos 2.0 Server.



**Fig. 3.** (A) Anti-*P. perniciosus* saliva IgG response in animals according to their immunization schedule. Results are expressed as the mean of the adjusted OD  $\pm$  SD. Asterisks show statistical significance relative to non-immunized sera ( $p < 0.01$ ). (B) Summary of total engorged sand fly females on animals of different immunization groups.

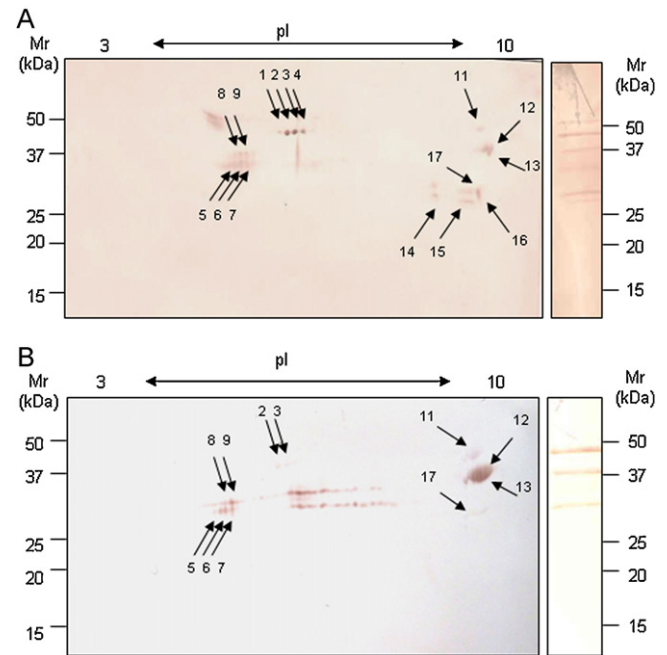
## 4. Discussion

### 4.1. *P. perniciosus* salivary protein profile studies

Due to the importance of sand fly saliva on leishmaniasis development, sand fly salivary proteins deserve a deeper insight. In the present study, *P. perniciosus* saliva was analyzed by a 2DE-MS/MS approach. In addition, *P. perniciosus* salivary antigens were identified by combining this technology and WB with hyperimmune sera of mice and hamsters.

At the salivary protein level, we did not find qualitative differences among the three *P. perniciosus* colonies collected from different areas of Spain and reared under identical laboratory conditions. These findings are in accordance with Kato et al. (2006), who described a high degree of conservancy among salivary proteins from populations of *Phlebotomus duboscqi* from Mali and Kenya. However, intraspecific differences on the salivary SDS-PAGE patterns between sand fly colonies of different origins and even among individuals of the same species have been described (Volf et al., 2000; Rohousova et al., 2011).

Protein salivary gland contents of the *P. perniciosus* colony from Madrid gradually increased with age, as previously described for other sand fly species (Volf et al., 2000; Prates et al., 2008). In fact, the complete salivary protein profile under our rearing conditions was reached at day four after adult emergence, which determined the minimum age for sand fly dissections.



**Fig. 4.** Salivary proteins recognition by sera of immunized animals. (A) Western blot after 1DE (40 glands) and 2DE (100 glands, IPG strip pH 3–10) with pooled sera of immunized hamsters. (B) Salivary proteins from 40 to 150 glands were separated by 1DE and 2DE, respectively, electroblotted onto PVDF membranes and incubated with the pooled sera of immunized mice. Spots numbers on gels correspond to those specified in Table 1. Molecular weight markers in kDa are indicated.

The *P. perniciosus* protein profile obtained is in accordance with the pattern previously described by SDS-PAGE (Volf et al., 2000; Volf and Rohousova, 2001; Anderson et al., 2006). There are only small differences in band intensities, which could be due to the different working amount of saliva or slight diversities among colonies.

### 4.2. 2DE salivary protein analysis

Most of the annotated sequences related to *P. perniciosus* sialome have been identified through the analysis of a cDNA salivary gland library and Edman degradation from 1DE gels (Anderson et al., 2006). There are still several salivary proteins that have been described at the DNA level but could not be found on the proteome either by Edman sequencing or by the 2DE-MALDI-TOF/TOF techniques presented in this report. This may be due to a low abundance of these proteins or inherent biochemical characteristics such as low molecular weight or alkaline isoelectric point. These facts could explain the absence among the identified proteins of several salivary proteins, such as ABA43053 (28 kDa, pI 10.4), ABB00905 (2.7 kDa, pI 10.6), ABA43064 (41 kDa, pI 9.5), ABA43062 (30 kDa, pI 8.3), ABA43061 (10 kDa, pI 4.8), ABA43060 (7 kDa, pI 11) and ABA43060 (13 kDa, pI 9). Among the 20 salivary proteins of *P. perniciosus* annotated by these authors, there were four proteins sequenced by Edman degradation and named as SP06, SP07, SP09, and SP10 that could not be identified by the 2DE approach. On the other hand, SP08 was one of the more abundant proteins we found in 2DE experiments. This protein was recently identified by mass spectroscopy after 1DE (Vlkova et al., 2011), however, it had not been previously describe by Edman degradation (Anderson et al., 2006).

Nowadays, the non predictive correlation between mRNA and protein levels expressed by a particular gene is well known. It is possible that even when a transcript is identified, it might not be expressed at the protein level. On the other hand, if a protein is identified, the corresponding genomic DNA can be automatically



designated as a protein-coding region (Chevalier, 2010). Thus, more work on identifying salivary proteins and their expression levels would be helpful to complement information obtained from DNA studies.

The 2DE-MS/MS approach used in this study revealed that 4 out of 10 proteins identified occurred in multiple spots in the proteome (Table 1), suggesting either protein isoforms or posttranslational modifications. Redundancy of isoforms in salivary proteins has been described in other arthropods (Ribeiro and Francischetti, 2003). This phenomenon has been suggested as being involved in the evolutionary adaptation of insects to ensure blood feeding (Francischetti et al., 2005). In the proteome of the hard tick *Ornithodoros moubata*, for instance, 17 close spots were identified as the same protein, TSGP1 (Oleaga et al., 2007). The same finding was observed for the triatomine bug *Pastrongylus megistus*, where several isoforms of lipocalins, proteins implicated in the transport of molecules such as histamine and nitric-oxide, were found on its proteome (Bussacos et al., 2011). Two general evolutionary trends in salivary proteins have been reported in sand flies. One group, present in metazoans and insects, includes conserved proteins which comprise apyrase, antigen 5 and endonuclease families. The other group consisted of PpSP15-like, PpSP32-like, 32 kDa, 39 kDa, and 16.1 kDa families, which underwent several gene duplication events and, therefore, show high levels of divergence (Anderson et al., 2006). Concretely, PpSP15 and Maxadilan show high levels of polymorphism (Milleron et al., 2004; Elnaïem et al., 2005). Two salivary proteins belonging to other phlebotomine species were identified as the best match on the *P. perniciosus* proteome. This data suggests that the proteins identified could either be novel salivary proteins or already annotated proteins with some modifications in their amino acid sequence. The protein identified as SP16 of *P. ariasi* probably corresponds to an isoform of SP04 of *P. perniciosus*, since only 3% of the peptides sequenced was non-coincident to the *P. perniciosus* homolog sequence. Following this trend, the best match for spot no. 19 was *P. argentipes* SP13. It could be a novel protein on *P. perniciosus* proteome since 42% of the peptide sequenced diverges from its related sequence of the closest *P. perniciosus* protein (SP09). Although, this observation should be taken with caution, since this finding is based on a unique peptide which led to its identification.

The linear set of spots that were identified as SP03, SP03B, SP08, or *P. ariasi* SP16 might reflect the phosphorylation process, as they contain potential phosphorylation sites (Table 1). However, further analyses are needed to evaluate whether these spot series correspond to phosphorylation modifications and their possible implication in immunogenicity. The fact that posttranslational modifications might play a role in sand fly saliva immunogenicity should be taken into account when choosing protein expression systems for the production of recombinants.

#### 4.3. Immunological studies

The different saliva immunization schedules carried out in mice and hamsters resulted in different levels of antibodies. The first schedule for mice demonstrated to be better than the second one at eliciting humoral immune response in terms of anti-saliva IgG levels, as they received greater number of bites. The correlation between bites and antibody levels has been previously described and it supports the use of saliva or salivary proteins as markers of sand fly exposure (Barral et al., 2000).

Immunoreactive proteins identified in this study were outlined for their potential as vaccine candidates. Immunogenic recognition differences were found between hamster and mice sera and they lay mainly in the intensity of the reaction. These differences may be due to the variability of immune responses elicited by these species as previously found in exposed mice and humans which showed

a similar *P. papatasi* and *Phlebotomus sergenti*-saliva recognition pattern with some differences in the intensity of the reaction (Rohousova et al., 2005). Following this trend, some valuable work has been already done to describe immunoreactive proteins in *L. longipalpis* saliva to the sera of dogs (Bahia et al., 2007; Hostomska et al., 2008).

Our results are consistent with previously described *P. perniciosus* salivary antigens recognized by hamster and rabbit sera (Volf and Rohousova, 2001). Furthermore, the antigens we found with sera of mice and hamsters after 2DE-WB matched some of the antigens highlighted by sera of dogs bitten by *P. perniciosus* which were identified through the combination of WB of 1DE gels and mass spectroscopy (Vlkova et al., 2011). Yellow proteins and apyrases were recognized by both hamsters and mice sera. However, D7-related proteins were found to be antigenic only for hamster sera.

A remarkable result is that most of the multiple spots identified as only one protein were recognized by sera of the immunized animals, highlighting their antigenicity.

In addition, yellow proteins (SP03 and SP03B), apyrases (SP01 and SP01B) and the unknown function SP08 are recognized by both hamster and mice sera and, therefore, could be adequate candidates for vaccine development. Concretely, yellow proteins are highly represented in sand fly saliva and absent in vertebrates. Indeed, a yellow protein belonging to *L. longipalpis* (LJM11) has recently been demonstrated to confer protection against *Leishmania* major infection (Xu et al., 2011).

As a final remark, the identified salivary proteins that elicit a host humoral immune response may be affecting *Leishmania* infection and consequently leishmaniasis development since both parasites and salivary proteins interact at the initial phase of the infection. It has been shown that anti-*L. longipalpis* humoral response and anti-*Leishmania chagasi* cell-mediated immunity appear simultaneously in individuals living in a visceral leishmaniasis endemic area of Brazil. This finding supports the hypothesis that induction of immune response against SGH can facilitate induction of a protective response against leishmaniasis (Gomes et al., 2002).

#### 5. Conclusion

This work is assumed to be the first attempt to establish a 2DE proteomic map of sand fly saliva. This has served not only to establish the protein pattern of *P. perniciosus* saliva, but also to describe the immunogenic proteins present in the saliva of this leishmaniasis vector. Isoforms or posttranslational modification presence in *P. perniciosus* salivary proteins are also highlighted.

All the spots were identified as sand fly salivary proteins, confirming this technology as an interesting tool to improve arthropod saliva knowledge. Nevertheless, the proteomic methodology comprises some drawbacks such as the high number of salivary glands needed, making proteomic experiments complicated. Moreover, some salivary proteins are out of the range of study (low molecular weight and alkaline isoelectric point). Furthermore, databases are not complete. Even though salivary protein databases are improving fast in sequence quantity and quality, they assume an added difficulty for proteomic analysis and database search.

Animal immunization schedules used in this work proved adequate for generating specific anti-saliva hyperimmune sera, as they were satisfactorily applied in antigen-finding experiments. This work is conceived as a starting point for the identification of sand fly salivary antigens and future work will be focused on their characterization for vaccine and markers of vector exposure assays.

#### Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgments

The authors thank Sonia Hernández for valuable technician help and Philip Glyn Saunders for helpful English proofreading. We also thank the staff of the National Centre for Cardiovascular Research (CNIC) for assistance with MS/MS analysis and the staff of Proteomics Unit of the Instituto de Salud Carlos III, especially Mercedes Jiménez, for technical advice. This study was partially funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project AGL2008-01592) and by EU grant GOCE-2003-010284 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext 029 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. Inés Martín-Martín is a PhD recipient of a fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FPI-MICINN).

## References

- Anderson, J.M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B.J., Reynoso, D., Seitz, A.E., Lawyer, P., Garfield, M., Pham, M., Valenzuela, J.G., 2006. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*, doi:10.1186/1471-2164-7-52.
- Bahia, D., Gontijo, N.F., Leon, I.R., Perales, J., Pereira, M.H., Oliveira, G., Correa-Oliveira, R., Reis, A.B., 2007. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol. Res.* 100, 449–454.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E.D., Valenzuela, J.G., Charlab, R., Barral-Netto, M., Ribeiro, J.M., 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 740–745.
- Bussacos, A.C., Nakayasu, E.S., Hecht, M.M., Assumpcao, T.C., Parente, J.A., Soares, C.M., Santana, J.M., Almeida, I.C., Teixeira, A.R., 2011. Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals. *J. Proteomics* 74, 1693–1700.
- Chen, H.Q., Yao, Q., Bao, F., Chen, K.P., Liu, X.Y., Li, J., Wang, L., 2011. Comparative proteome analysis of silkworm in its susceptibility and resistance responses to *Bombyx mori* densovirus. *Intervirology*, doi:10.1159/000322381.
- Chevalier, F., 2010. Highlights on the capacities of gel-based proteomics. *Proteome Sci.* 8, 23, doi:10.1186/1477-5956-8-23.
- Choumet, V., Carmi-Leroy, A., Laurent, C., Lenormand, P., Rousselle, J.C., Namane, A., Roth, C., Brey, P.T., 2007. The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. *Proteomics* 7, 3384–3394.
- Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Cheng, L., Laughinghouse, A., Ward, J.M., Elnaïem, D.E., Fischer, L., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2009. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathog.*, doi:10.1371/journal.ppat.1000441.
- Dea-Ayuela, M.A., Rama-Iniguez, S., Bolás-Fernández, F., 2006. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics* 6, 4187–4194.
- Drahota, J., Lipoldova, M., Volf, P., Rohousova, I., 2009. Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. *Parasite Immunol.* 31, 766–770.
- Elnaïem, D.E., Meneses, C., Slotman, M., Lanzaro, G.C., 2005. Genetic variation in the sand fly salivary protein, SP-15, a potential vaccine candidate against *Leishmania* major. *Insect Mol. Biol.* 14, 145–150.
- Francischetti, I.M., My Pham, V., Mans, B.J., Andersen, J.F., Mather, T.N., Lane, R.S., Ribeiro, J.M., 2005. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari, Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 1142–1161.
- Gomes, R.B., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., Costa, J., Miranda, J.C., Caldas, A., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., Barral, A., 2002. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J. Inf. Dis.* 186, 1530–1534.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M.J., Oliveira, F., Menezes, M.J., Silva, C., de Oliveira, C.I., Miranda, J.C., Elnaïem, D.E., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Brodskyn, C.I., 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7845–7850.
- Góngora, N., Acestor, N., Quadroni, M., Fasel, N., Saravia, N.G., Walker, J., 2003. Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomedica* 23, 153–160.
- Hostomska, J., Rohousova, I., Volf, P., Stanneck, D., Mencke, N., Volf, P., 2008. Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 443–450.
- Kalume, D.E., Okulate, M., Zhong, J., Reddy, R., Suresh, S., Deshpande, N., Kumar, N., Pandey, A., 2005. A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. *Proteomics* 5, 3765–3777.
- Kamhawi, S., 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect./Institut Pasteur* 2, 1765–1773.
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., Sacks, D., 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290, 1351–1354.
- Kato, H., Anderson, J.M., Kamhawi, S., Oliveira, F., Lawyer, P.G., Pham, V.M., Sangare, C.S., Samake, S., Sissoko, I., Garfield, M., Sigutova, L., Volf, P., Doumbia, S., Valenzuela, J.G., 2006. High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya). *BMC Genomics*, doi:10.1186/1471-2164-7-226.
- Kongsuwan, K., Josh, P., Zhu, Y., Pearson, R., Gough, J., Colgrave, M.L., 2011. Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). *J. Insect Physiol.* 56, 212–226.
- Kumari, S., Kumar, A., Samant, M., Sundar, S., Singh, N., Dube, A., 2008. Proteomic approaches for discovery of new targets for vaccine and therapeutics against visceral leishmaniasis. *Proteomics Clin. Appl.* 2, 372–386.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Marzouki, S., Ben Ahmed, M., Boussoffara, T., Abdeladhim, M., Aleya-Bouafif, N.B., Namane, A., Hamida, N.B., Salah, A.B., Louzir, H., 2011. Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 653–661.
- Milleron, R.S., Mutebi, J.P., Valle, S., Montoya, A., Yin, H., Soong, L., Lanzaro, G.C., 2004. Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 286–293.
- Molina, R., 1991. Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (*Diptera, Psychodidae*). *Res. Rev. Parasitol.* 51, 87–89.
- Oleaga, A., Escudero-Población, A., Camafaita, E., Pérez-Sánchez, R., 2007. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1149–1159.
- Prates, D.B., Santos, L.D., Miranda, J.C., Souza, A.P., Palma, M.S., Barral-Netto, M., Barral, A., 2008. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (*Diptera, Psychodidae*) according to age and diet. *J. Med. Entomol.* 45, 409–413.
- Rachinsky, A., Guerrero, F.D., Scoles, G.A., 2008. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* 152, 294–313.
- Ribeiro, J.M., 1987a. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 32, 463–478.
- Ribeiro, J.M., 1987b. Vector salivation and parasite transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82 (Suppl. 3), 1–3.
- Ribeiro, J.M., Francischetti, I.M., 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 73–88.
- Ribeiro, J.M., Mans, B.J., Arca, B., 2010. An insight into the sialome of blood-feeding nematocera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 767–784.
- Rogers, K.A., Titus, R.G., 2003. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary *in vitro* immune responses. *Parasite Immunol.* 25, 127–134.
- Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbek, Y., Volf, P., 2005. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493–499.
- Rohousova, I., Volf, P., 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol.* 53, 161–171.
- Rohousova, I., Volf, P., Nova, S., Volf, P., 2011. Individual variability of salivary gland proteins in three *Phlebotomus* species. *Acta Trop.*, doi:10.1016/j.actatropica.2011.12.004.
- Samuelson, J., Lerner, E., Tesh, R., Titus, R., 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.* 173, 49–54.
- Serrano-Pinto, V., Acosta-Perez, M., Luviano-Bazan, D., Hurtado-Sil, G., Batista, C.V., Martinez-Barnette, J., Lanz-Mendoza, H., 2011. Differential expression of proteins in the midgut of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 752–758.
- Sharma, S., Singh, G., Chavan, H.D., Dey, C.S., 2009. Proteomic analysis of wild type and arsenite-resistant *Leishmania donovani*. *Exp. Parasitol.* 123, 369–376.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Theodos, C.M., Ribeiro, J.M., Titus, R.G., 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect. Immun.* 59, 1592–1598.
- Thiel, M., Bruchhaus, I., 2001. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. *Med. Microbiol. Immunol.* 190, 33–36.
- Titus, R.G., Ribeiro, J.M., 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239, 1306–1308.
- Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Garfield, M.K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Sacks, D.L., Ribeiro, J.M., 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J. Exp. Med.* 194, 331–342.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Gonzalez, E.C., de Miranda-Santos, I.K., Marinotti, O., Francischetti, I.M., Ribeiro, J.M., 2002. The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Mol. Biol.* 11, 149–155.
- Vlkova, M., Rohousova, I., Drahota, J., Stanneck, D., Krudedewagen, E.M., Mencke, N., Otranto, D., Volf, P., 2011. Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus*

- bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. PLoS Negl. Trop. Dis. 5 (10), e1344, doi:[10.1371/journal.pntd.0001344](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001344).
- Volf, P., Tesarova, P., Nohynkova, E.N., 2000. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. Med. Vet. Entomol. 14, 251–256.
- Volf, P., Rohousova, I., 2001. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. Parasitology 122 (Pt 1), 37–41.
- Wasinpiyamongkol, L., Patramool, S., Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Doucoure, S., Mouchet, F., Seveno, M., Remoue, F., Demetere, E., Brizard, J.P., Jouin, P., Biron, D.G., Thomas, F., Misse, D., 2009. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. Proteomics 10, 1906–1916.
- WHO, 2010. Control of the Leishmaniases. World Health Organization, Geneva. Tech Rep Ser No.: 949.
- Xu, X., Oliveira, F., Chang, B.W., Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Reynoso, D., Pham, V.M., Elnaïem, D.E., Kamhawi, S., Ribeiro, J.M., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., 2011. Structure and function of a yellow protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania* major infection. J. Biol. Chem., doi:[10.1074/M111.268904](https://doi.org/10.1074/M111.268904).
- Yao, C., Li, Y., Donelson, J.E., Wilson, M.E., 2010. Proteomic examination of *Leishmania chagasi* plasma membrane proteins: contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. Proteomics Clin. Appl. 4, 4–16.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)



## Rapid communication

# The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain

R. Molina<sup>a,\*</sup>, M.I. Jiménez<sup>a,\*</sup>, I. Cruz<sup>a</sup>, A. Iriso<sup>b</sup>, I. Martín-Martín<sup>a</sup>, O. Sevillano<sup>b</sup>, S. Melero<sup>c</sup>, J. Bernal<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Dirección General de Medio Ambiente, Comunidad Autónoma de Madrid, Spain

<sup>c</sup> Leganés Council, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 3 April 2012

Received in revised form 4 May 2012

Accepted 13 May 2012

### Keywords:

*Phlebotomus perniciosus*

*Leishmania infantum*

*Lepus granatensis*

Xenodiagnosis

Sylvatic cycles

Wild reservoir

## ABSTRACT

Xenodiagnosis of *Leishmania* infection in hares (*Lepus granatensis*) from a focus of human leishmaniasis in Fuenlabrada at southwestern Madrid region (Spain) proved that they are infective to *Phlebotomus perniciosus*. Molecular characterization of isolates obtained from sand flies infected after xenodiagnosis demonstrates that hares were infected by *Leishmania infantum*. This is the first evidence of the transmission of *L. infantum* from hares to sand flies. Moreover the results confirm the role that these animals can play as wild reservoirs of leishmaniasis for the recent outbreak of visceral leishmaniasis in Madrid.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* (*Leishmania chagasi*) is a zoonosis in which the reservoirs are wild animals, commensals or domestic animals. The dog is the main domestic reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis although wild mammals have been found infected with *L. infantum* (WHO, 2010). In the Mediterranean basin have been found infected among wild mammals Algerian mouse (*Mus spretus*), badgers (*Meles meles*), European wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), mongooses (*Herpestes ichneumon*), pine martens (*Martes martes*), genet (*Geneta geneta*), Iberian lynxes (*Lynx pardinus*), weasels (*Mustela nivalis*), wolves (*Canis lupus*), red foxes (*Vulpes vulpes*), black rat (*Rattus rattus*), and brown rat (*Rattus norvegicus*)

(Rioux et al., 1968; Bettini et al., 1978; Martín-Iniesta et al., 1982; Abranches et al., 1983; Morillas-Márquez et al., 1985; Baneth et al., 1998; Fisa et al., 1999; Criado-Fornelio et al., 2000; Portús et al., 2002; Sobrino et al., 2008; Quinnell and Courtenay, 2009; Papadogiannakis et al., 2010; Millán et al., 2011). Moreover, a *L. infantum* PCR-positive rabbit spleen was recently found in Spain (Chitimia et al., 2011). On the other hand Yarkend hare (*Lepus yarkandensis*) has also been found infected with *L. infantum* in China (Liao et al., 2009). In southern Europe, the leishmaniasis was initially rural but is increasingly spreading to suburbs of cities.

The research reported here was conducted among hares (*Lepus granatensis*), in the context of studies of the human leishmaniasis outbreak started late 2010 in Fuenlabrada, southwestern Madrid (Spain).

## 2. Methods

Blood samples from the ear of hares captured for scientific purposes were collected to check *Leishmania* positivity

\* Corresponding authors. Tel.: +34 91 822 3674; fax: +34 91 509 7034.  
E-mail addresses: [rmolina@isciii.es](mailto:rmolina@isciii.es) (R. Molina), [mjimenez@isciii.es](mailto:mjimenez@isciii.es) (M.I. Jiménez).

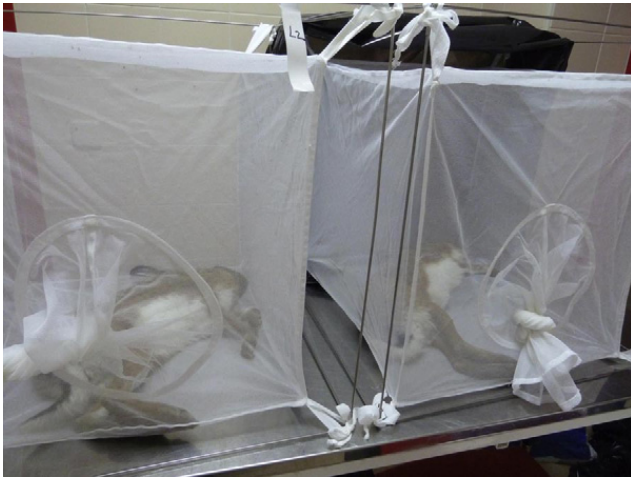


Fig. 1. Xenodiagnoses of hares.

using the rK39 dipstick. Animal handling was in accordance to the standards specified in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals and approved by ethics committees for animal care and experimentation. Xenodiagnosis was conducted using a colony of *Phlebotomus perniciosus* established in 1987 from sand flies captured near Madrid (Molina, 1991). The colony is reared at the Medical Entomology Unit of the Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain. Sand flies are maintained in an environmental chamber under controlled conditions of temperature ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ), relative humidity (90–100%), and lighting cycle (17 h light/7 h dark). Hares were anaesthetized with a blend of ketamine (15 mg/kg) and xylazine (2–3 mg/kg) by intramuscular injection and individually introduced into cube-shaped nets (50 cm  $\times$  50 cm  $\times$  50 cm). Animals were exposed for 1 h to 100 unfed, 7-day-old female sand flies released inside the nets (Fig. 1). After exposure, fed sand flies on each hare were collected using a mouth aspirator and released into individual nets (15 cm  $\times$  15 cm  $\times$  15 cm), kept inside the environmental chamber, and maintained with 30% glucose for 4–7 days. For the dissections flies were anaesthetized with  $\text{CO}_2$  and placed individually in a drop of sterile PBS on a slide. The midgut was then drawn out and examined under microscope for promastigotes. When a gut was found to be infected it was gently ruptured with sterile needles, used to inoculate a tube with RPMI medium, and placed at  $28^\circ\text{C}$  so that flagellates can be isolated and then grown in mass in NNN plus RPMI media for molecular characterization. The procedure was conducted with the help of a Bunsen burner to prevent contamination. PCR analyses were based on ITS1, ITS2, regions and hsp70 gene. Direct sequencing of the positive products was performed in order to characterize the flagellates (Kuhls et al., 2005; Fraga et al., 2010).

### 3. Results

Seven apparently healthy hares rK39 positive were selected. Xenodiagnosis studies were carried out in two sessions (December 2011 and January 2012). Four out of seven rK39 positive hares (57.14%) were able to infect a mean 4.7% *P. perniciosus* sand flies (0–10.6%). Results

of xenodiagnoses are shown in Table 1. Moreover, three out of four flagellate cultures from positive hares by xenodiagnosis were successfully grown. The hsp70 sequence of three isolates was 100% consistent to *L. infantum*. The ITS type was different to previous A, B or A/B ITS types described in the Mediterranean basin (Kuhls et al., 2005), but 100% identical to the sequence of the *L. infantum* strain MHOM/ES/87/Lombardi (GenBank accession number AJ000295).

### 4. Discussion

Accordingly, in this study we demonstrate for the first time that apparently healthy naturally infected hares can be infectious to a competent *L. infantum* vector (*P. perniciosus*). The existence of *L. infantum* infection in a high proportion of wild carnivores in Spain – wolves, foxes, Egyptian mongooses, genets, and Iberian lynxes – have been shown suggesting the existence of a sylvatic cycle of leishmaniasis independent of dogs (Sobrino et al., 2008). Furthermore studies on the role of lagomorphs as reservoirs of leishmaniasis are very scarce worldwide. A study recently carried-out in the south-eastern Spain suggests that wild rabbits have a very low risk of becoming infected with *L. infantum* (Chitimia et al., 2011). In a survey of reservoir hosts of kala-azar in the Tarim Basin (China) *L. infantum* was isolated from 3 Yarkend hares but their infectivity on sand flies were not studied (Liao et al., 2009). Sylvatic cycles of leishmaniasis independent of dog have been proposed in studies undertaken to evaluate the infectiousness of wild animal to phlebotomine sand flies. Thus, a sylvatic cycle of *L. chagasi* was proved among crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in Brazil where a third part of healthy PCR-positive foxes against *L. chagasi* infected one in twelve *L. longipalpis* sandflies fed on it (Gomes et al., 2007). However, xenodiagnosis results have been not published neither in any Old World wild carnivore nor lagomorphs (Sobrino et al., 2008). In our study four out of seven rK39 positive hares were able to infect a mean 4.7% *P. perniciosus* sand flies.

Leishmaniasis is endemic in rural, periurban, and sub-urban areas of Madrid region (central Spain). The number of new cases of human leishmaniasis has been steadily increasing in the southwest of Madrid since 2010. Thus, the incidence of the disease grew from 3 cases/100,000 inhabitants in 2009 to 55.7 in 2011 (unpublished data). In that area it exists a new periurban green park of around 450 ha. Afforestation of this park began in 2005, finishing in 2011. During a visit of exploration undertaken in that area in 2011 it was observed the presence of a large population of hares in the park, very close to the houses where many cases of leishmaniasis were diagnosed (Figs. 2 and 3). Due to the high density of hare population in the zone it was conducted a study of a small number of hares by xenodiagnosis to assess the role of these animals in the epidemiology of the disease. It is noteworthy that xenodiagnoses were carried out when the transmission of the parasite was over for at least two months. It should also be noted that hares are no burrowing wild animals that are more exposed to sand fly bites which could contribute to maintaining higher sand fly populations. This can happen in the protected great green park created very close to the houses of Fuenlabrada

**Table 1**

Xenodiagnosis of seven rK39 positive hares after the exposition to 100 *P. perniciosus* female sand flies.

Date of xenodiagnosis	Hare code	No. fed sand flies	No. of fed sand flies dissected	Total no. of positive sand flies (%)
01/12/11	L18	85	63	5 (7.9%)
01/12/11	L19	55	25	0
11/01/12	L34	75	47	5 (10.6%)
11/01/12	L35	58	38	2 (5.3%)
11/01/12	L38	82	45	0
11/01/12	L39	63	42	0
11/01/12	L40	80	33	3 (9.1%)



**Fig. 2.** Periurban green park close to the urban area in Fuenlabrada (Madrid).

town. On the other hand the park is free of predators and hunting is forbidden which has allowed the hare population easily increases. As hares are infected by *L. infantum* in a high proportion and are infective to sand fly vectors they could be considered at least as secondary wild reservoir of infection, suggesting the existence of a sylvatic transmission cycle linked to the urban periphery. The association with periurban green areas indicates that the urban transmission cycle is dependent upon a relationship with the sylvatic environment. Environmental changes in new

locations in an endemic country as occurred in Fuenlabrada (Spain) have led to the urbanization of leishmaniasis in this focus (Harhay et al., 2011).

## 5. Conclusion

The data presented here provide evidence on the infectivity of apparently healthy *L. infantum* infected hares (*L. granatensis*) to phlebotomine sand flies (*P. perniciosus*). The present work provides significant information related to the role of potential sylvatic reservoirs in spread of leishmaniasis that always have to be taken into account in epidemiological studies. The role of hares in the epidemiology of leishmaniasis deserves attention for further detailed studies in these and other endemic sites of visceral leishmaniasis. Likewise such information will be very useful for the design of appropriate disease prevention and control strategies.

## Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgements

We thank the hunters of Fuenlabrada for their assistance catching hares. Our gratitude to Elisa Marco, Gregorio Pintor, and Pablo Prieto from the Servicio de Salud Pública



**Fig. 3.** Presence of a high population of hares in the park.

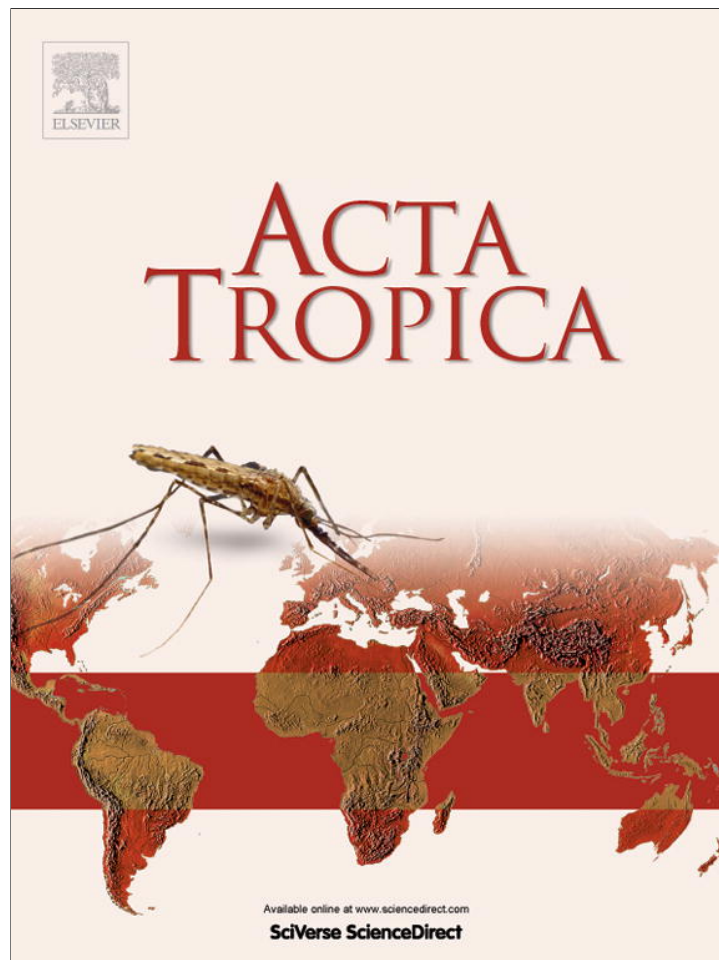


(Área 9) for his support. We also thank Estela González for assistance and support. The authors thank VISAVET for offering us their biosafety facilities where trials were conducted. We would also like to thank the Dirección General de Medio Ambiente, Consejería de Medio ambiente y Ordenación del Territorio, Comunidad Autónoma de Madrid (CAM). This study was partially sponsored and funded by the Dirección General de Ordenación e Inspección de la Consejería de Sanidad (CAM) and the Colegio de Veterinarios de Madrid. This study also was partially funded by EU grant GOCE-2003-010284 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext 045 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. Susana Melero is a Veterinarian collaborator of Leganes Council. We would like to dedicate this work to the memory of Bob Killick-Kendrick, his star will always shine brightly upon us all.

## References

- Abranches, P., Conceição-Silva, F.M., Ribeiro, M.M.S., Lopes, F.J., Gomes, L.T., 1983. Kala-azar in Portugal IV. The wild reservoir: the isolates of a *Leishmania* from a fox. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 420–421.
- Baneth, G., Dank, G., Keren-Kornblatt, E., Sekeles, E., Adini, I., Eisenberger, C.L., Schnur, L.F., King, R., Jaffe, C.L., 1998. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 722–725.
- Bettini, S., Gradoni, L., Pozio, E., 1978. Isolation of *Leishmania* strains from *Rattus rattus* in Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 441–442.
- Chitimia, L., Muñoz-García, C.I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., del Río, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Giménez-Font, P., Jiménez-Montalbán, P., Martínez-Ramírez, A., Meseguer-Meseguer, J.M., García-Bacete, I., Sánchez-Isarria, M.A., Sanchis-Monsonís, G., García-Martínez, J.D., Vicente, V., Segovia, M., Berriatua, E., 2011. Cryptic Leishmaniasis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 181, 12–16.
- Criado-Fornelio, A., Gutierrez-García, L., Rodríguez-Caabeiro, F., Reus-García, E., Roldán-Soriano, M.A., Díaz-Sánchez, M.A., 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.* 92, 245–251.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87–97.
- Fraga, J., Montalvo, A.M., De Doncker, S., Dujardin, J.C., Van der Auwera, G., 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect. Genet. Evol.* 10, 238–245.
- Gomes, R.B., Mendonça, I.L., Silva, V.C., Ruas, J., Silva, M.B., Cruz, M.S.P., Barral, A., Costa, C.H.N., 2007. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 127–133.
- Harhay, M.O., Oliaro, P.L., Costa, D.L., Costa, C.H.N., 2011. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 27, 403–409.
- Kuhls, K., Mauricio, I.L., Pratlong, F., Presber, W., Schönlank, G., 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* 7, 1224–1234.
- Liao, L.F., Yan, S.S., Wuso, B., Wu, M., Xu, B., Zhang, Y., Hou, Y.Y., Lei, G., 2009. *Leishmania infantum* firstly isolated from Yarkend hare (*Lepus yarkandensis*). *Chin. J. Vector Bio. Control* 20, 45–47 (in Chinese, with English abstract).
- Martin-Iniesta, F., Marin-Iniesta, E., Martin-Luengo, F., 1982. Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniasis en la región murciana. *Rev. Iber. Parasitol.* 42, 307–313.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E., 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound Emerg. Dis.* 58, 352–357.
- Molina, R., 1991. Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Res. Rev.* 51, 87–89.
- Morillas-Márquez, F., Benavides-Delgado, I., González-Castro, J., Reyes-Magaña, A., Valero-López, A., 1985. Occurrence of *Leishmania* sp. in *Rattus rattus* in the province of Granada. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60, 768–770.
- Papadogiannakis, E., Spanakos, G., Kontos, V., Menounos, P.G., Tegos, N., Vakalis, N., 2010. Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoo. Public Health* 57, 23–25.
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M.J., Fisa, R., Castillejo, S., 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev. Iber. Parasitol.* 62, 72–76.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915–1934.
- Rioux, J.A., Albaret, J.L., Houin, R., Dedet, J.P., Lanotte, G., 1968. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée de renard (*Vulpes vulpes* L.). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 43, 421–428.
- Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millán, J., Revilla, M., Arnal, M.C.M.C., Trisciuglio, A., Gortázar, C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 155, 198–203.
- WHO, 2010. Control of the Leishmaniasis. In: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva, 186 pp.





This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Short communication

# Identifying salivary antigens of *Phlebotomus argentipes* by a 2DE approach



Inés Martín-Martín, Ricardo Molina\*, Maribel Jiménez\*

Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 18 October 2012

Received in revised form 9 January 2013

Accepted 5 February 2013

Available online xxx

### Keywords:

*Phlebotomus argentipes*

*Phlebotomus perniciosus*

Salivary proteins

Leishmaniasis

Proteomics

Two-dimensional electrophoresis

## ABSTRACT

In the Indian subcontinent visceral leishmaniasis, also known as kala-azar, is caused by the protozoa *Leishmania donovani* and is transmitted to humans by the bite of infected female sand flies *Phlebotomus argentipes* in an anthroponotic cycle. Sand fly saliva is known to play an important role in host infection outcome after an infective bite. Immunogenicity of *P. argentipes* saliva has already been described. However, specific antigens that can contribute to these immunogenic properties are unknown. This work focuses on the identification of antigens present in *P. argentipes* saliva through the combination of two-dimensional electrophoresis (2DE) and Western blot (WB). Analysis of the salivary protein profile showed a gradual increase of the protein content in relation to the age of sand flies, reaching the complete salivary protein pattern at day five, which marked the minimum age for dissections. The 2DE revealed a reproducible protein profile that matched the classic monodimensional SDS-PAGE pattern (1DE). The resulting salivary proteomic map consisted of at least 30 spots located between 10 and 60 kDa. According to their isoelectric points, spots were mostly distributed around pH ranges: 5–6 and 9–10. In the proteomic maps, the presence of isoforms or posttranslational modifications was also highlighted since several spots were identified as the same protein. Analysis by *in silico* prediction programs located several potential glycosylation and phosphorylation sites in the aminoacidic sequences. On the other hand, pooled sera of immunized hamsters through the bite of uninfected sand flies showed elevated anti-saliva IgG levels. These sera permitted the detection of 4 protein bands and at least 20 protein spots in 1DE and 2DE respectively, followed by WB. The antigens were identified by MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF and *de novo* sequencing as D7-related proteins, PpSP15-like proteins, antigen 5-related proteins, apyrases, and several proteins without assigned protein family. Absence of cross-reactivity between *P. argentipes* and *Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies determined by ELISA and WB was highlighted in this study, confirming that specific salivary antigens from different sand fly vectors need to be sought when designing vector-borne vaccines and markers for vector exposure assays.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is considered one of the most neglected diseases that threaten developing countries. It presents an estimated incidence of 0.5 million new cases per year and over 50,000 deaths occur annually. The Indian subcontinent (India, Nepal and Bangladesh) and East Africa account for the majority of cases of VL in the world (Boelaert et al., 2009). In the Indian subcontinent VL, also known as kala-azar, is caused by the protozoa *Leishmania donovani* and is transmitted to humans by the bite of infected female sand flies *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) in an anthroponotic cycle (WHO, 2010). According to the

magnitude of VL in the Indian subcontinent, it is necessary to reduce the incidence of this disease. Elimination of VL is conceived as a multidisciplinary strategy which focuses on implementing patient treatment and vector control. In addition, developing a leishmaniasis vaccine will contribute to slow the incidence progress. There are evidences of acquirement of protective immunity after contact with the parasite, which supports that vaccines against VL may be possible (Handman, 2001).

Sand fly saliva is known to play a role in *Leishmania* parasite establishment (Ribeiro, 1987; Samuelson et al., 1991; Theodos et al., 1991; Titus and Ribeiro, 1988). The enhancing effects attributed to salivary gland content are related to their anti-hemostatic properties as well as their ability to modulate host immune responses (Kamhawi, 2000; Ribeiro, 1987; Rogers and Titus, 2003; Rohousova and Volf, 2006). On the other hand, immunization against sand fly saliva results in humoral and/or cellular responses that lead to

\* Corresponding authors. Tel.: +34 918223674; fax: +34 915097034.

E-mail addresses: [rmolina@isci.es](mailto:rmolina@isci.es) (R. Molina), [mjimenez@isci.es](mailto:mjimenez@isci.es) (M. Jiménez).

the protection against the establishment of infection (Collin et al., 2009; Gomes et al., 2008; Kamhawi et al., 2000; Valenzuela et al., 2001). Therefore, several remarkable research groups have focused on the study of the saliva of these insects (Barral et al., 2000; Rohousova and Volf, 2006; Valenzuela, 2002). Lately, the identification of antigenic salivary proteins of different leishmaniasis vectors has emerged as an important task in the field of anti-*Leishmania* vaccine development (Rohousova and Volf, 2006).

Furthermore, exposure to insects can be tracked by measuring the humoral immune responses to saliva elicited by vertebrate hosts after the bite since anti-saliva antibody levels correlate with the number of blood-fed sand flies (Hostomska et al., 2008; Vlkova et al., 2011). Currently, anti-saliva antibodies are being used to measure the exposure of humans or domestic animals to different arthropod vectors such as *Anopheles* spp., *Glossina* spp., or *Triatoma infestans* (Drame et al., 2011; Poinsignon et al., 2008; Schwarz et al., 2009). Concerning to sand flies, this methodology has been applied for instance to some endemic VL areas of Brazil and the Indian sub-continent to estimate animal reservoirs and human exposure to *Lutzomyia longipalpis* and *P. argentipes* bites, respectively (Barral et al., 2000; Clements et al., 2010; Gidwani et al., 2011; Souza et al., 2010; Teixeira et al., 2010). Valuable work has been done using salivary gland extracts. However, the complexity of obtaining massive amounts of saliva by manual dissections makes these experiments difficult to be widely performed. In order to overcome this problem, recombinant proteins that could be used as markers are being sought. Interesting analyses have been already done using recombinant proteins in endemic VL areas in Brazil (Barral et al., 2000; Souza et al., 2010; Teixeira et al., 2010). Even correlation between exposure to some arthropods such as *Anopheles darlingi* or *Phlebotomus perniciosus*, and the risk of acquiring the disease they transmit has already been established (Andrade et al., 2009; Vlkova et al., 2011).

In the field of entomology, proteomics have been mainly used to identify both salivary proteins and proteins involved in host-parasite interaction. Concretely, 2DE has contributed to unravel the array of the proteins present in the salivary glands of mosquitoes (Choumet et al., 2007; Djegbe et al., 2011; Wasinpiyamongkol et al., 2009), ticks (Oleaga et al., 2007), and triatomines (Assumpção et al., 2010; Bussacos et al., 2011; Costa et al., 2011). Immunoreactive salivary proteins of *P. perniciosus* to bitten dogs have been described by Vlkova et al. (2011) through the combination of WB of 1DE gels and mass spectrometry analysis. Likewise, our group analyzed the saliva of *P. perniciosus* by 2DE and identified antigens by WB and mass spectrometry using sera of mice and hamsters experimentally immunized by *P. perniciosus* bites (Martín-Martín et al., 2012). Although immunogenicity of *P. argentipes* saliva has already been described (Ghosh and Mukhopadhyay, 1998); specific antigens that can contribute to these immunogenic properties are unknown. Consequently, the aim of this work was to study *P. argentipes* salivary proteins by a 2DE-MS/MS approach. In addition, salivary antigens have been identified by combining this technology and WB with hyperimmune sera of hamsters experimentally exposed to *P. argentipes* bites.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sand flies and preparation of salivary gland homogenate

Sand flies were maintained at 27 °C and 17:7 light–darkness photo-period at the Medical Entomology Unit of the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain. *P. argentipes* colony, originating from India, was kindly supplied by Dr. Killick-Kendrick in 1994. The *P. perniciosus* colony was established in 1987 from sand

flies captured at a leishmaniasis endemic area of Madrid (Molina, 1991).

Salivary glands were dissected from 1 to 8-day-old sand flies for age dependence analysis. For the other experiments, glands were dissected from 5 to 8-day-old adult female flies. Glands were stored in Tris 5 mM, usually in groups of 20 salivary glands in 10 µl of Tris buffer, for proteome analysis. Glands were dissected and stored in PBS for ELISA tests. Vials containing the salivary glands were frozen immediately after dissection and kept at –80 °C until needed.

The salivary gland homogenate (SGH) for ELISA and SDS-PAGE was prepared by sonication (Labsonic, Sartorius, Goettingen, Germany). For proteomics, glands were treated with lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS and 40 mM Tris, Bio-Rad, Hercules, CA) in the presence of 1% protease inhibitor (Amersham, Piscataway, NJ). After 2 h of incubation, the SGH was centrifuged at 10,000 × g for 5 min to remove insoluble material. Protein content was estimated as 222.5 ng per salivary gland by µBCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

### 2.2. One and two-dimensional electrophoresis

The protein contents of 15–40 salivary glands were separated by one-dimensional electrophoresis (1DE) on 15% discontinuous gels under reducing conditions (Laemmli, 1970). Regarding 2DE, the equivalent protein of 40–150 salivary glands was submitted to isoelectric focusing (IEF). Protein samples were diluted in rehydration solution (DeStreak solution, Amersham, Piscataway, NJ, 1% ampholytes, Bio-Rad, Hercules, CA or 0.5% ampholytes for strips pH 7–11, Amersham, Piscataway, NJ) and loaded into 11 cm IPG-strips of different pH ranges (3–10, 4–7 and 7–10; Bio-Rad, Hercules, CA, and 7–11; Amersham, Piscataway, NJ). All IEF procedures were performed in a Protean IEF cell (Bio-Rad, Hercules, CA) under a maximum current of 50 µA/strip and a constant temperature of 20 °C. IPG strips were equilibrated with 20 mg/ml DTT and 25 mg/ml iodoacetamide through standard procedures. Equilibrated strips were applied to 15% home-made polyacrylamide gels (Criterion Cassettes, Bio-Rad, Hercules, CA) and sealed with overlay agarose (Bio-Rad, Hercules, CA). Gels were run at 200 V at 15 °C using the Criterion Dodeca Cell (Bio-Rad, Hercules, CA) until the tracking dye reached the end-point. Protein spots were visualized by compatible MS silver or colloidal Coomassie Blue staining and gels were scanned in a GS800 densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA). At least three independent experiments were performed for each condition analyzed, generating reproducible results.

### 2.3. In-gel trypsin digestion, mass spectrometry and database searching

Stained protein spots were manually excised from the gels and submitted to MS analyses, which were sent to the National Centre for Cardiovascular Research (CNIC, Madrid, Spain). Protein samples were in-gel reduced, alkylated and digested according to Shevchenko et al. (1996). MALDI samples were prepared by mixing equal volumes of the digestion solution and a matrix solution. This mixture was deposited onto a 600 µm AnchorChip prestructured MALDI probe (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) and allowed to dry at room temperature. Samples were automatically analyzed in an Ultraflex MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) with an automated analysis loop using internal mass calibration, under the control of flexControl 2.2 software (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). MALDI-MS and MS/MS spectra were manually inspected in detail and reacquired, recalibrated and/or relabeled when necessary using the programs above as well as homemade software. MALDI-MS and MS/MS data were combined through the BioTools 3.0 program (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) to search a non-redundant protein



database (NCBI;  $\sim 10^7$  entries; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, US; or SwissProt;  $\sim 5 \times 10^5$  entries; Swiss Institute for Bioinformatics, Switzerland) using the Mascot software (<http://www.matrixscience.com>). Doubtful spots were analyzed using a 4800 Plus Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Canada) at the Genomics and Proteomics Center, Complutense University of Madrid. *De novo* sequencing from fragmentation spectra of peptides was performed using DeNovo tool software (Applied Biosystems), tentative sequences were manually checked and validated. Homology search of these sequences was obtained by NCBI pBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

#### 2.4. In silico prediction of glycosylation and phosphorylation processes

Salivary proteins that were found on *P. argentipes* proteome, were *in silico* analyzed through bioinformatic programs. Glycosylation sites were predicted using NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>, Julenius et al., 2005) and NetOGlyc 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>, Gupta et al., in preparation) for N and O-glycosylation sites respectively. Phosphorylation sites prediction was done using NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>, Blom et al., 1999).

#### 2.5. Sera

Sera from three Syrian Golden hamsters that were used to maintain *P. argentipes* colony were obtained. They had been exposed eight times to the bites of approximately 150 uninfected *P. argentipes* each. Besides, sera from ten hamsters experimentally immunized through the bite of 100 uninfected *P. perniciosus* once per week over ten weeks were used (Martín-Martín et al., 2012). Animals were bled by intracardiac puncture one week after the last exposure and pooled sera were used in the experiments. Control sera were obtained from non-immunized animals.

Animals were anaesthetized with ketamine (150 mg/kg intramuscularly) before either each immunization process or sacrifice. Hamsters were housed at the animal facilities in the ISCIII. Animal handling was carried out according to the standards specified in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals and approved by ethics committees for animal care and experimentation.

#### 2.6. ELISA

Specific anti-saliva IgG antibody response generated by the immunized animals was measured by direct ELISA, according to Rohousova et al. (2005) with minor modifications. Plates were coated with 1 salivary gland per well. Each pooled sera were diluted 1:50 in 0.1% BSA, 0.3% Tween-20, PBS and tested in duplicate. The control wells were coated with SGH, but no serum was added. Goat anti-hamster IgG peroxidase-conjugated antibodies (1:4000, Southern Biotech, Birmingham, AL) were incubated for 45 min at 37°C. IgG antibody levels were reported as adjusted OD (aOD), calculated for each serum as a mean OD value of three different experiments minus the OD value of the control wells. The non-parametric Mann-Whitney *U*-test was performed for statistical analysis, using Prism version 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Statistical significance was considered when the *p*-value was <0.05.

#### 2.7. Western blot analysis

1DE and 2DE gels (pH 3–10 and 7–11) were electroblotted onto a PVDF membrane and incubated overnight in blocking buffer (3% BSA, Sigma, St. Louis, CA; 2% ECL Blocking reagent,

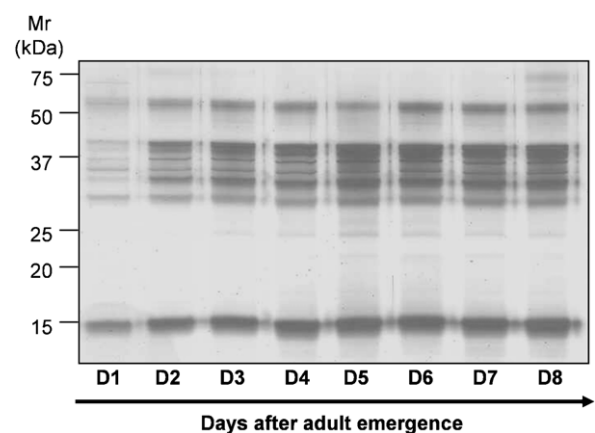
Amersham, Piscataway, NJ). After three washes with 0.5% PBS-T, the membranes were incubated overnight with pooled sera (1:25) at 4°C. After washing, the membranes were incubated with goat anti-hamster IgG (1:3500, Southern Biotech, Birmingham, AL) peroxidase-conjugated antibodies for 1 h at room temperature. Immunogenic proteins were visualized by Metal Enhanced DAB reagent following the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, Goettingen, Germany). 2DE-WB experiments with sera of immunized and non-immunized hamsters were carried out in parallel.

### 3. Results

#### 3.1. Analysis of *P. argentipes* saliva

*P. argentipes* salivary profile in 1DE was made up of at least 10 protein bands which were clustered into two groups according to their molecular weight; between 25 and 60 kDa and around 15 kDa. Salivary gland contents gradually increased with the age of the sand flies and at 5 days old, protein amount has reached its maximum as is shown in Fig. 1.

*P. argentipes* salivary 2DE map consisted of at least 30 spots that matched the molecular weight distribution with the 1DE profile (Fig. 2A). 30 spots were excised from the gels and were identified on the basis of their peptide mass fingerprint (MS) or by its combination with peptide fragmentation (MS/MS, Table 1). 22 out of the 30 sequenced spots led to the identification of 11 salivary proteins of *P. argentipes*. Four of them occurred in multiple spots, suggesting the presence of isoforms or posttranslational modifications (PTM). Concretely, spots 1–6, which were found on the 2DE gels as a linear set of spots, and spot 7, found at a distinct Mw and pI, were identified as the D7-related protein SP10. Similarly, spots 8–10 resulted in the detection of the PpSP15-like protein SP01 and the three adjacent spots named as 13–15 as well as spot 21 were identified as the antigen 5-related protein SP05. Spot 18 was identified as SP20 through its MS/MS data. In addition, *de novo* sequencing from fragmentation spectra of two peptides of spot 18 was performed leading to the identification of one peptide which matched the protein SP56 and that peptide was not found on SP20 sequence (Fig. 3A). Three spots were detected over pH 10, when using strips of pH 7–11 and they were identified as SP09 (spot 20), SP05 and SP06 (spot 21) and SP02 (spot 22). Interestingly, in the same spot more than one salivary protein were identified (spots 18 and 21), and alignment of these proteins showed that sequenced peptides were unique in each protein confirming the presence of mixture of proteins (Fig. 3A and B). Furthermore, the best match for MS/MS



**Fig. 1.** Salivary protein profile of *P. argentipes* according to the age of sand fly females (1–8 days after adult emergence). SGH of 15 glands were loaded into each lane. Molecular weight markers in kDa are indicated.

**Table 1**  
*Phlebotomus argentipes* salivary proteins identified by MALDI-TOF/TOF.

Spot no.	Best match NCBI accession no.	Protein family	Immunogenicity	Mass (kDa)	Exp/Theo	pI Exp/Theo	Matched peptides	Peptide sequences	Coverage %	MASCOT score <sup>b</sup>	
1	ABA12141. SP10 [ <i>P. argentipes</i> ]	D7-related proteins	Yes	32.666	29.403	5.60	5.49	5	K.TIDFFLK.E; R.LVDEDNLVIPFR.K; R.LVDEDNLVIPFRK.L; K.SINVDTIATQYETR.G; K.DNLQHAYYGTPESNK.W	19	89
2	ABA12141. SP10 [ <i>P. argentipes</i> ]	D7-related proteins	Yes	32.666	29.403	5.74	5.49	3	R.LVDEDNLVIPFR.K; <b>R.LVDEDNLVIPFRK.L</b> ; K.DNLQHAYYGTPESNK.W	11	114
3	ABA12141. SP10 [ <i>P. argentipes</i> ]	D7-related proteins	Yes	32.666	29.403	5.95	5.49	6	K.TIDFFLK.E; K.WFAQHPDVKPK.R; R.LVDEDNLVIPFR.K; <b>R.LVDEDNLVIPFRK.L</b> ; K.IYKWELPDNADTHCYVK.C; R.GLTVPADLENLKGATDGSCEAVYKK.T	28	165
4	ABA12141. SP10 [ <i>P. argentipes</i> ]	D7-related proteins	No	32.666	29.403	6.17	5.49	14	K.TIDFFLK.E; K.TIDFFLKE.D; R.NADQTLWAFR.T; R.GLTVPADLENL.K.G; K.WFAQHPDVKPK.R; R.LVDEDNLVIPFR.K; K.MNGTPEEAFDGC.R.K; R.LVDEDNLVIPFRK.L; <b>K.SINVDTIATQYETR.G</b> ; K.WELPDNADTHCYVK.C; K.DNLQHAYYGTPESNK.W; K.EKDNLQHAYYGTPESNK.W; K.IYKWELPDNADTHCYVK.C; R.GLTVPADLENLKGATDGSCEAVYKK.T	50	393
5	ABA12141. SP10 [ <i>P. argentipes</i> ]	D7-related proteins	No	32.666	29.403	6.46	5.49	5	R.NADQTLWAFR.T; R.LVDEDNLVIPFR.K; <b>R.LVDEDNLVIPFRK.L</b> K.SINVDTIATQYETR.G; K.DNLQHAYYGTPESNK.W	20	207
6	ABA12141. SP10 [ <i>P. argentipes</i> ]	D7-related proteins	No	32.666	29.403	6.82	5.49	6	R.NADQTLWAFR.T; K.WFAQHPDVKPK.R; R.LVDEDNLVIPFR.K; R.LVDEDNLVIPFRK.L; K.SINVDTIATQYETR.G; K.DNLQHAYYGTPESNK.W;	25	112
7	ABA12141. SP10 [ <i>P. argentipes</i> ]	D7-related proteins	No	52.666	29.403	9.85	5.49	10	K.TIDFFLK.E; K.HACSMYYR.L; K.WFAQHPDVKPK.R; R.LVDEDNLVIPFR.K; K.MNGTPEEAFDGC.R.K; R.LVDEDNLVIPFRK.L; K.LKMNGTPEEAFDGC.R.K; K.DNLQHAYYGTPESNK.W; K.EKDNLQHAYYGTPESNK.W; K.IYKWELPDNADTHCYVK.C	35	183
8	ABA12133. SP01 [ <i>P. argentipes</i> ]	PpSP15-like proteins	Yes	16.666	16.777	6.39	6.08	7	K.NAATISITR.K; K.DVLLNFEAIK.D; K.NCYSIVHYQR.C; K.LKDVLNFEAIK.D; R.KNCYSIVHYQR.C; K.DVLLNFEAIKDNEVDK.T; R.CAYVNDIFTFSAYDEAIR.K	39	133
9	ABA12133. SP01 [ <i>P. argentipes</i> ]	PpSP15-like proteins	No	16.666	16.777	6.68	6.08	6	K.NAATISITR.K; K.NCYSIVHYQR.C; K.LKDVLNFEAIK.D; R.KNCYSIVHYQR.C; K.DVLLNFEAIKDNEVDK.T; R.CAYVNDIFTFSAYDEAIR.K	39	135
10	ABA12133. SP01 [ <i>P. argentipes</i> ]	PpSP15-like proteins	No	16.666	16.777	6.89	6.08	4	K.NAATISITR.K; <b>K.NCYSIVHYQR.C</b> ; K.DVLLNFEAIKDNEVDK.T; R.CAYVNDIFTFSAYDEAIR.K	37	141

Table 1 (Continued)

Spot no.	Best match NCBI accession no.	Protein family	Immunogenicity	Mass(kDa)	Exp/Theo	pI	Exp/Theo	Matched peptides	Peptide sequences	Coverage %	MASCOT score <sup>b</sup>
11	ABA12147. SP17 [ <i>P. argentipes</i> ]	Unknown	Yes	34.666	31.683	9.10	7.07	6	K.VNYNLYR.E; K.GFNNSNYIK.Y; <b>R.DILQLQGFIR.S</b> ; K.VNYNLYREELEQK.Y; K.NTGNSEQVEAQSQSYAYK.K; R.NVVNDIVEVTFGDEEPLN.- <b>K.NILNYPVYYNAFK.K</b>	23	174
12	ABA12139. SP07 [ <i>P. argentipes</i> ]	PpSP15-like proteins	Yes	17.333	16.925	9.78	8.99	1	K.LAEYNVR.T; K.LFLHHNRL.L; <b>K.AIGHFTAFIHEK.S</b>	9	100
13	ABA12137. SP05 [ <i>P. argentipes</i> ]	Antigen 5-related proteins	Yes	31.333	32.337	6.46	9.18	3	K.LAEYNVR.T; K.NSGQFDRK.T; R.EWFLEYK.L; K.LFLHHNRL.L; R.GSMSPFQSAAK.M; K.KLFLHHNRL.L; <b>K.AIGHFTAFIHEK.S</b> ; R.TCEFKHDQCR.S;	9	125
14	ABA12137. SP05 [ <i>P. argentipes</i> ]	Antigen 5-related proteins	Yes	31.333	32.337	7.40	9.18	9	K.LAEYNVR.T; R.EWFLEYK.L; K.LFLHHNRL.L; K.LFLHHNRL.L; <b>K.AIGHFTAFIHEK.S</b> ; R.TCEFKHDQCR.S;	29	205
15	ABA12137. SP05 [ <i>P. argentipes</i> ]	Antigen 5-related proteins	Yes	31.333	32.337	7.83	9.18	9	K.LAEYNVR.T; R.EWFLEYK.L; K.LFLHHNRL.L; K.LFLHHNRL.L; <b>K.AIGHFTAFIHEK.S</b> ; R.TCEFKHDQCR.S;	29	233
16	ADD20271. Disulfide isomerase [ <i>Glossina morsitans</i> ]	Disulfide isomerases	No	56.000	57.441	4.94	4.80	1	K.LCTFGPGLPARPHIGCK.N; K.HLCDASEVIEPIPDILK.N; K.HLCDASEVIEPIPDILKNPR.N; <b>K.QLAPIFDQGEK.F</b>	6	102
17	ABA12135. SP03 [ <i>P. argentipes</i> ]	Apyrases	Yes	43.000	37.487	9.85	9.03	23	K.LWVFLPR.K; K.NEGVEFMR.N; K.CTAEKYSR.Q; K.LWVFLPR.C; K.IITANEDFTK.V; K.NDPASGFSSFK.F; K.SQNLHYFTR.F; R.QEETTGCNK.I; K.ETNSDSMWVK.E; R.DNGENYDLTMK.S; K.QEGMKAEWATR.K; K.TIEKDGATATYAK.V; R.GAELSELLNFNSK.L; K.TKETNSDSMWVK.E; K.SIDWHKQYEA VK.K; K.ILDTKNEGVEFMR.N; K.FIPGTNNEHILA.K.T; K.NEGVEFMRNPQGIV.-; K.MYVGSTGLMWYNEK.T; R.FIPFAVIADLDKDSIK.D; K.YGELRDNGENYDLTMK.S; K.IITANEDFTKVNVAVSITDNK.N; K.VNVAVSITDNKNDPASGFSSFK.F K.DSHFIKYDYK.T	62	509
18	ABA12149. SP20 [ <i>P. argentipes</i> ]	Unknown	Yes	38.000	29.585	9.85	9.49	1	VHTDTISITKTR <sup>a</sup>	3	76
19	ABA12151. SP56 [ <i>P. argentipes</i> ]	Unknown	Yes	38.000	32.328	9.85	6.86	1			
19	ABA12138. SP06 [ <i>P. argentipes</i> ]	Unknown	Yes	35.000	26.984	9.49	9.64	10	K.QNRPVQR.N; R.ELVIDESTAR.V; K.SYDFRENGR.T; K.NRELVIDESTAR.V; K.LFETNKAEVIAK.G; K.LFETNKAEVIAK.G; K.DAPATYVFKSYDFRE; K.GGSASQSRPPAPDKSPGK.T; R.NLQSYKAPATYVFK.S; K.MDATGTVTVSNPDRER.I K.STIFCQR.G; R.TGNEIYR.K; K.THFTVNF.K.D; K.STIFCQRGGIGK.S; K.FDKEDFWSLPR.T; K.SVDFDDRDDFIIGK.R; R.VESDEELFYSSFDLT.K.S; K.RVESDEELFYSSFDLT.K.S	37	255
20	ABA12140. SP09 [ <i>P. argentipes</i> ]	33 kDa unknown function	Yes	37.000	36.221	10.01	9.04	8		22	122

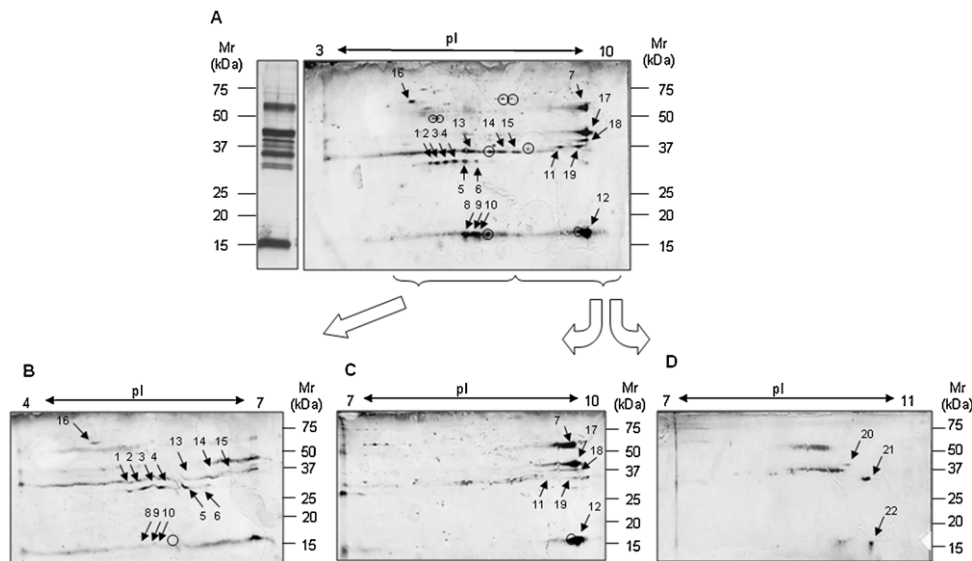
Table 1 (Continued)

Spot no.	Best match NCBI accession no.	Protein family	Immunogenicity	Mass (kDa)	Exp/Theo	pI Exp/Theo	Matched peptides	Peptide sequences	Coverage %	MASCOT score <sup>b</sup>	
21	ABA12137. SP05 [ <i>P. argentipes</i> ]	Antigen 5-related proteins	Yes	31.333	32.337	10.40	9.18	21	K.LAEYNVR.T; K.WNDELAK.L; K.NSGQFDRK.T; R.EWFLEYK.L; K.LFLHIHNR.L; K.SDKVGCASK.F; R.GSMSPFQSAAK.M; K.GQPCSQCSQSK.K; K.AIGHFTAFIHEK.S; K.DAQLMPITEDTK.K; R.TCEFKHDQCR.S; K.MPMLKWDELAK.L; K.DAQLMPITEDTKK.L; K.VYTKGQPCSQCSQSK.K; K.LASQSHDMMFTTGSQK.N; K.AIGHFTAFIHEKSDK.V; K.WNDELAKLAEYNVR.T; K.LCTFGPGLPARPHIGCK.N; K.HLCDASEVIEPIPDILK.N; K.FKEYLVACNYCYTNMMK.E; K.HLCDASEVIEPIPDILKNPR.N	66	197
	ABA12138. SP06 [ <i>P. argentipes</i> ]	Unknown	Yes	31.333	26.984	10.40	9.64	9	K.GGSASQSRPPADKSPGK.T; R.ELVIDESTAR.V; R.VRQNSQDRK.K; R.QNSQDRK.Q; R.NLQSYKDAPATYVFK.S; K.SYDFRENGR.T; K.LFETNKAEVIAK.G; K.MDATGTVTVSNPDRER.I; K.QNRPVQR.N	40	171
22	ABA12134. SP02 [ <i>P. argentipes</i> ]	PpSP15-like proteins	Yes	15.333	16.135	10.40	9.37	6	R.NCANEALAR.S; K.LTDILIQYGGVAK.N; K.KLTDILIQYGGVAK.N; K.TDLFSYTSYATAVIK.Y; K.TEVCILHCEYSHYGAGNNFK.I; R.KTEVCILHCEYSHYGAGNNFK.I	43	133

Sequences in bold correspond to fragmentation peptides.

<sup>a</sup> Peptide analyzed by *de novo* sequencing.

<sup>b</sup> MASCOT scores above 50 indicate significant identity or extensive homology.



**Fig. 2.** 1DE and 2DE maps of *P. argentipes* salivary proteins using 15 and 60 glands respectively. (A) Protein profiles of 1DE and 2DE (pH 3–10), (B) 2DE (pH 4–7), (C) 2DE (pH 7–10), and (D) 2DE (pH 7–11). Molecular weight markers in kDa are indicated. Spots numbers on gels correspond to those specified in Table 1. Circles indicate the spots that could not be identified on the basis of their MS or MS/MS data.

data of spot 16 after database search was a disulfide isomerase of *Glossina morsitans* (GenBank ID: ADD20271). Spot numbers in Table 1 correspond to those shown in Fig. 2A–D.

### 3.2. ELISA

Pooled sera of immunized hamsters against *P. argentipes* bites showed significantly higher anti-saliva IgG levels (mean aOD  $\pm$  standard deviation:  $0.849 \pm 0.256$ ) when comparing to control animals ( $0.060 \pm 0.025$ ,  $p$  value = 0.002), ensuring the convenient use of these sera for antigens finding in WB. No signal significantly greater than the one elicited by control sera was detected when analyzing sera of immunized hamsters against saliva of *P. argentipes* in ELISA plates coated with *P. perniciosus* SGH.

The same finding was observed for *P. perniciosus* hyperimmune sera when using SGH of *P. argentipes* as shown in Fig. 4A.

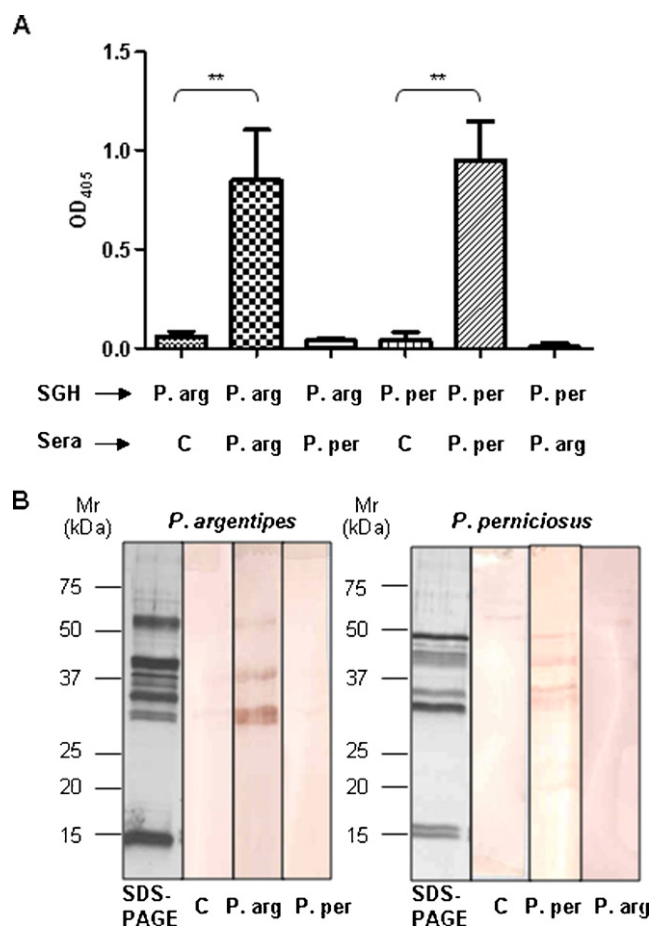
### 3.3. Antigenic proteins

The analysis of antigenic proteins with pooled hamster sera by WB revealed four major antigenic bands of 55, 37, 30 and 29 kDa after 1DE (Fig. 4B). No protein recognition was observed when sera of immunized hamsters against *P. perniciosus* saliva were tested with *P. argentipes* salivary proteins and *vice versa*, confirming the absence of cross-reactivity (Fig. 4B).

Pooled hamster sera of *P. argentipes*-immunized animals recognized at least 20 protein spots after 2DE-WB, which were identified as SP01, SP02, SP03, SP05, SP06, SP07, SP09, SP10, SP17, SP20 and SP56 (Table 1). Some intense recognition signals corresponded to



**Fig. 3.** Sequences alignments of salivary proteins. (A) Part of the alignment of proteins found in spot 18. Underlined aminoacids correspond to the *de novo* sequenced peptide which permitted the identification of SP56 and dashed underlined aminoacids led to the identification of SP20 by MS/MS. (B) Complete alignment of proteins found in spot 21. Underlined aminoacids correspond to the peptides that led to the identification of SP06 and dashed underlined aminoacids correspond to the sequenced peptides of SP05 by MS/MS. Alignments were done using Megalign program (DNASTAR, Lasergene).



**Fig. 4.** Cross-reactivity between *P. argentipes* and *P. perniciosus* saliva-antibodies. (A) IgG antibody response of sera of immunized animals with *P. argentipes* (P. arg) and *P. perniciosus* saliva (P. per) when using SGH of both species. Lane C: control sera. Antibody levels are expressed as the mean of the adjusted OD  $\pm$  SD. Asterisks show statistical significance relative to non-immunized sera ( $p < 0.01$ ). (B) Recognition of salivary proteins of both sand fly species (*P. perniciosus* and *P. argentipes*) by sera of immunized animals with *P. argentipes* (P. arg) and *P. perniciosus* (P. per) saliva determined by WB (40 gland/lane), and their corresponding silver-stained gel (15 glands/lane).

faint or almost not noticeable spots in the stained gels (Fig. 5). Therefore, they could not be analyzed by MALDI-TOF/TOF. Furthermore, spots recognition differed in signal intensity. Specifically spots 11, 13–15, 17, 18, 19 and mostly 21 were strongly recognized by sera of immunized animals. On the other hand, spots 1–3, 7, 8, 12, 20 and 22 showed a fainter signal.

Sera of non-immunized hamsters were used as negative control as done for 1DE-WB, neither they give a recognition signal (data not shown).

#### 4. Discussion

The one-dimensional protein pattern obtained for *P. argentipes* saliva is consistent with the profile previously published (Anderson et al., 2006). The content of salivary proteins increases in relation to the age of the sand flies. Besides, the increase of protein levels in the saliva of *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus langeroni*, *L. longipalpis*, *Lutzomyia migonei*, and *Lutzomyia ovallesi* with age has been studied by other authors (Nieves et al., 2011; Abdel-Badei et al., 2012; Prates et al., 2008; Volf et al., 2000). In previous studies, we documented that salivary content is also age dependent for *P. perniciosus*, and it reaches its maximum protein amount at day 4 after adult emergence (Martín-Martín et al., 2012). In the colony of *P.*

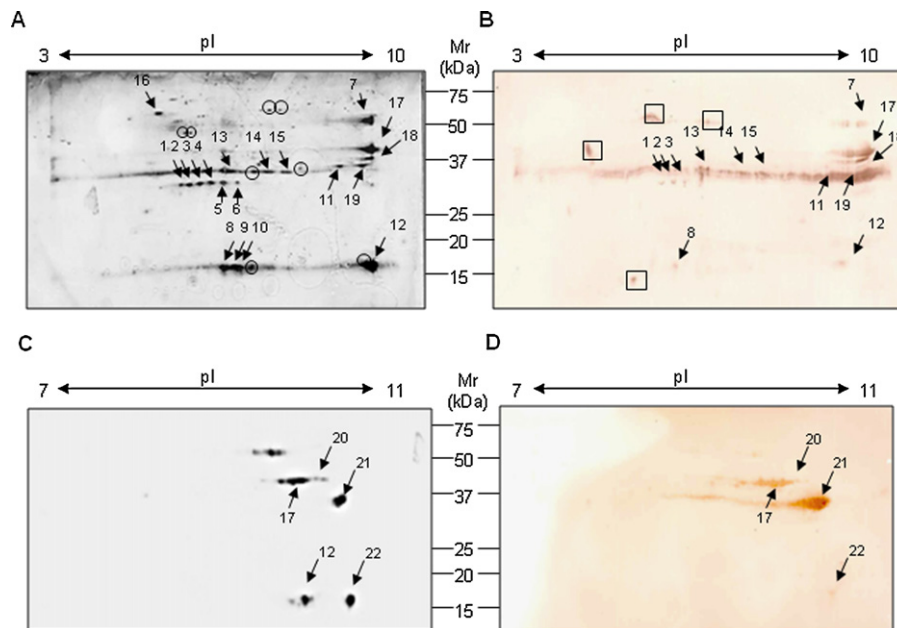
*argentipes* settled in our laboratory, we confirmed that at 5 days after emergence the amount of salivary proteins has reached its maximal point. Therefore, it was established that the day 5 onwards was the optimal age for gland dissections.

There were 9 *P. argentipes* salivary proteins that had been previously described through Edman degradation (Anderson et al., 2006). Among them, we detected through proteomic techniques, a D7-related protein (GenBank ID: ABA12141), three PpSP15-like proteins (GenBank ID: ABA12133, ABA12139 and ABA12134), an antigen 5-related protein (GenBank ID: ABA12137), a 33 kDa of unknown function protein (GenBank ID: ABA12140), an apyrase (GenBank ID: ABA12135), a protein similar to PpSP32 from *P. papatasi* (GenBank ID: ABA12138) and a protein without assigned family (GenBank ID: ABA12147). However, the proteins SP20 and SP56 were not identified by Edman degradation (Anderson et al., 2006) but we detected them through 2DE. In addition, the best match for MS/MS data of spot 16 after database search was a disulfide isomerase of *G. morsitans* (GenBank ID: ADD20271). Spot 16 did not seem to be immunogenic to immunized hamsters. Besides, *G. morsitans* disulfide isomerase was not either recognized in 2DE-WB by sera of immunized rabbits with saliva (Alves-Silva et al., 2010). Disulfide isomerases catalyze the rearrangement of disulfide bonds within proteins during folding in the endoplasmic reticulum (Wilkinson and Gilbert, 2004). Therefore, they could be part of the salivary gland membrane which may explain the absence of sera recognition in WB. The sequenced peptide which led to the identification of spot 16 (K.QLAPIFDQLGEK.F) showed homology with several expressed sequenced tags (EST) of *L. longipalpis* and *P. papatasi* when analyzed by BLASTn. Furthermore, EST of *P. papatasi* (GenBank ID: EY203349) and *L. longipalpis* (GenBank ID: AM106536) matched disulfide isomerase sequences of distinct organisms after BLASTn and BLASTx alignments which indicate that these transcripts possibly codify disulfide isomerases.

Most of the spots in the gels displayed a reasonable correlation of the theoretical pI and Mr values with the experimental data. However, spots 7, 11 and 13–15 showed deviation on their pI value, while spot 7 was found at a different Mr and pI location from its theoretical value on the 2DE gel. This may be due to the presence of PTMs that grant the protein a wide variation of Mr and pI. Sometimes, these changes in gel mobility are due to glycosylation presence. In addition, glycosylation have been described in salivary proteins of other arthropods, and concerning sand flies, O and N-glycosylation sites have been predicted for several yellow-related proteins of different sand fly species (Rohousova et al., 2012a). Besides, glycosylated proteins have been detected in *L. longipalpis*, *Phlebotomus dubosqi*, *Phlebotomus arabicus* and *Phlebotomus tobbi* (Volf et al., 2000; Hostomska et al., 2009; Rohousova et al., 2012b). *In silico* analysis predicted several N and O-glycosylation sites for the sequenced *P. argentipes* salivary proteins (Table 2). Although, further studies would be needed to confirm that glycosylation could be the source of the gel mobility shift.

The 2DE-MS/MS approach used in this study revealed that several proteins occurred in multiple spots in the proteome (Table 1 and Fig. 2), suggesting either PTMs or protein isoforms presence. According to PTMs, the linear set of spots that were identified as SP10, SP01 and SP05 might be a reflection of a phosphorylation process, as their sequences contain potential phosphorylation sites (Table 2) and these type of PTM usually shows this appearance on 2DE gels in consequence of changes on pI values (Vitorino et al., 2004). Indeed, several salivary proteins already showed electrophoretic mobility shifts after 1DE which could be attributed to PTMs (Anderson et al., 2006; Valenzuela et al., 2001). Furthermore, this gel mobility shifts may also be due to the presence of isoforms. Redundancy of isoforms in salivary proteins has been described in other arthropods (Bussacos et al., 2011; Charneau et al., 2007; Oleaga et al., 2007; Ribeiro and Francischetti, 2003).





**Fig. 5.** Recognition of *P. argentipes* salivary proteins by sera of immunized hamsters through 2DE-WB. (A and B) Silver-stained gel from 100 glands separated on IPG strip of pH 3–10 and its correspondent WB using hyperimmune hamster sera. (C and D) Colloidal Coomassie Blue-stained gel of salivary proteins from 40 glands separated on IPG strips of pH 7–11 and its correspondent WB using hyperimmune hamster sera. Spots numbers on gels correspond to those specified in Table 1. Circles indicate the spots that could not be identified on the basis of their MS or MS/MS data. Squares indicate recognition signal but no apparent or very diffuse spot presence on their corresponding stained gel. Molecular weight markers in kDa are indicated.

**Table 2**

*In silico* prediction of glycosylation and phosphorylation sites in *Phlebotomus argentipes* salivary proteins.

Spot no.	Protein (NCBI accession no.)	Protein family	Predicted O-glycosylation sites <sup>a</sup>		Predicted N-glycosylation sites <sup>b</sup>		Predicted phosphorylation sites <sup>c</sup>		
			Ser/Thr	Position	Asn-Xaa-Ser/Thr	Position	Ser	Thr	Tyr
1–7	SP10 (ABA12141)	D7-related proteins	–	–	–	–	6	5	5
8–10	SP01 (ABA12133)	PpSP15-like proteins	–	–	NASS	19	3	1	1
11	SP17 (ABA12147)	Unknown	T	146	NYTA	257	15	5	1
			T	148					
			T	149					
			T	159					
			T	152					
			T	202					
			T	204					
			S	206					
			S	208					
12	SP07 (ABA12139)	PpSP15-like proteins	–	–	–	–	3	2	1
13–15	SP05 (ABA12137)	Antigen 5-related proteins	–	–	–	–	7	3	6
17	SP03 (ABA12135)	Apyrases	–	–	–	–	6	2	1
18	SP20 (ABA12149)	Unknown	T	117	NETR	76	8	6	1
			T	119	NYTA	236			
			T	123					
			T	125					
			T	126					
			S	127					
			T	128					
			T	131					
			T	132					
	SP56 (ABA12151)	Unknown	T	147	NETR	77	6	5	1
			T	149					
			T	150					
			T	155					
19	SP06 (ABA12138)	Unknown	S	76	NVSD	89	12	5	4
			S	84					
			T	88					
			S	91					
20	SP09 (ABA12140)	33 kDa unknown function	–	–	NKTH	69	12	1	6
22	SP02 (ABA121349)	PpSP15-like proteins	–	–	–	–	2	1	1

<sup>a</sup> O-glycosylation sites prediction performed with NetOGlyc 3.1 Server.

<sup>b</sup> N-glycosylation sites prediction performed with NetNGlyc 1.0 Server.

<sup>c</sup> Phosphorylation sites prediction performed with NetPhos 2.0 Server.

This phenomenon has been suggested to be involved in the evolutionary adaptation of hematophagous insects to blood feeding success (Francischetti et al., 2005). Besides, the most studied sand fly salivary proteins: Maxadilan and PpSP15 are known to be highly polymorphic (El-naïem et al., 2005; Milleron et al., 2004).

Sera of immunized animals exclusively exposed to *P. argentipes* bites selectively recognized the salivary proteins of this vector and not the related proteins from *P. perniciosus* saliva as demonstrated by ELISA and WB experiments (Fig. 4A and B respectively). These two techniques highlight different epitopes, expanding the confirmation of absence of cross-reactivity between *P. perniciosus* and *P. argentipes* saliva antibodies. Inversely, sera of immunized hamsters against *P. perniciosus* saliva did not react either with *P. argentipes* salivary proteins. This finding is in accordance to the fact that specificity of sand fly antigens is related to the phylogenetic distance of the insect taxons (Volf and Rohousova, 2001). It has been demonstrated for animals immunized against salivary proteins of distant sand fly species such as *P. papatasi* (subgenus *Phlebotomus*) and either *P. perniciosus* (subgenus *Larroussious*) or *Phlebotomus halepensis* (subgenus *Adlerius*). Although, these last two species showed a slight degree of cross-reactivity due to their close phylogenetic relationship (Volf and Rohousova, 2001). On the other hand, cross-reactivity between *P. argentipes* and *P. papatasi* salivary antigens has been described in exposed population in some areas in India, where this two sand fly species coexist sympatrically. Concretely, specific tests have been developed to discriminate between exposure to the VL vector (*P. argentipes*) and to the non VL vector (*P. papatasi*) by pre-adsorbing sera with *P. papatasi* saliva (Clements et al., 2010).

The antigenic salivary proteins of *P. argentipes* described in this work are in accordance with the salivary antigens of other sand fly species previously described. Concretely, sera of dogs exposed to *L. longipalpis* bites recognized several proteins including apyrases, D7 and yellow-related proteins (Bahia et al., 2007; Hostomska et al., 2008). In the same way, sera of dogs exposed to *P. perniciosus* bites, recognized proteins which were identified after mass spectrometry as endonuclease, apyrases, PpSP15-like proteins, D7, antigen 5, yellow-related proteins and others without assigned protein family (Vlkova et al., 2011). Recently, *P. tobbi* salivary antigens for immunized rabbits were described mostly as apyrases, yellow-related proteins, antigen 5-related proteins PpSP32-like proteins, D7-related proteins, PpSP15-like proteins and most probably hyaluronidase (Rohousova et al., 2012b). In *P. argentipes*, we also describe immunogenicity for apyrases (SP03), D7-related proteins (SP10), antigen 5-related proteins (SP05), several proteins without assigned family (SP17, SP20, SP56, SP06, SP09). A weak reaction to PpSP15-related proteins (SP01, SP02, SP07) was detected in 2DEWB, however, the PpSP15 proteins were not recognized as immunogenic in 1DE. Therefore, antigenicity of PpSP15-related proteins in *P. argentipes* remains unclear and further studies should be carried out in order to clarify this issue.

It could be appreciated in WB that some intense recognition signals corresponded to faint or almost not noticeable spots in the stained gels (Fig. 5). Therefore, they could not be analyzed by MALDI-TOF/TOF. A possible explanation could be that antigen detection by WB is more sensitive than detection by silver or colloidal Coomassie Blue staining. Additionally, slightly noticeable differences between sera recognition of the spots identified as the same protein were found after WB. This finding suggests that either isoforms may differ in immunogenicity or PTMs may be involved in elicit this immune response as recently stated by Rohousova et al. (2012a) who pointed that different yellow-related proteins belonging to a single sand fly species showed different lectin binding activity. Therefore, it should be taken into account when selecting a molecule for protein expression as well as the system in which the production of recombinants is going to be performed.

## 5. Conclusions

2DE proteomic maps of different pH ranges have been established for the salivary proteins of *P. argentipes* for the first time. This proteomic technique permitted to highlight the presence of isoforms or posttranslational modifications.

The combination of 2DE, WB, MALDI-TOF/TOF and *de novo* sequencing successfully enabled to identify the antigenic pattern and specific antigens of *P. argentipes* saliva. Notwithstanding these potentials, the proteomic methodology comprises some drawbacks including the high number of salivary glands needed. In addition, the identification of the proteins by MS and MS/MS analysis is easily obscured by the lack of information in databases.

Absence of cross-reactivity between *P. argentipes* and *P. perniciosus*-saliva antibodies was highlighted in this study, confirming that specific salivary antigens from different sand fly vectors need to be sought when designing vector-borne vaccines and markers for vector exposure assays.

This work is assumed to offer the first description of the specific proteins that contribute to the immunogenicity of the saliva of *P. argentipes*. Due to their capability to elicit a humoral response, these salivary antigens should be taking into account when searching for epidemiological markers of exposure. Further characterization of cellular immune responses of these antigenic proteins should be carried out to determine whether they could be selected as vaccine candidates against kala-azar.

## Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgements

The authors thank Sonia Hernández for valuable technician help. We also thank the staff of the Proteomics Unit of CNIC and the Faculty of Pharmacy (UCM) for assistance with MS/MS analysis. This study was partially funded by the Spanish Ministry of Science & Innovation (Project AGL2008-01592) and by EU grant GOCE-2003-010284 EDENext and is cataloged by the EDENext Steering Committee as EDENext 031 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. Inés Martín-Martín is a PhD recipient of a fellowship from the Spanish Ministry of Science & Innovation (FPI-MICINN).

## References

- Abdel-Badei, N.M., Khater, E.I., Daba, S., Shehata, M.G., 2012. Morphometrics and protein profiles of the salivary glands of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* sand flies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 235–242.
- Alves-Silva, J., Ribeiro, J.M., Van Den Abbeele, J., Attardo, G., Hao, Z., Haines, L.R., Soares, M.B., Berriman, M., Aksoy, S., Lehane, M.J., 2010. An insight into the salivary glands of *Glossina morsitans morsitans*. *BMC Genomics* 11, 213.
- Anderson, J.M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B.J., Reynoso, D., Seitz, A.E., Lawyer, P., Garfield, M., Pham, M., Valenzuela, J.G., 2006. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 7, 52.
- Andrade, B.B., Rocha, B.C., Reis-Filho, A., Camargo, L.M., Tadei, W.P., Moreira, L.A., Barral, A., Barral-Netto, M., 2009. Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malar. J.* 8, 121.
- Assumpção, T.C., Charneau, S., Santiago, P.B., Francischetti, I.M., Meng, Z., Araujo, C.N., Pham, V.M., Queiroz, R.M., Castro, C.N., Ricart, C.A., Santana, J., Ribeiro, J.M., 2010. Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. *J. Proteome Res.* 10, 669–679.
- Bahia, D., Gontijo, N.F., Leon, I.R., Perales, J., Pereira, M.H., Oliveira, G., Correa-Oliveira, R., Reis, A.B., 2007. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol. Res.* 100, 449–454.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E.D., Valenzuela, J.G., Charlab, R., Barral-Netto, M., Ribeiro, J.M., 2000. Human immune response to



- sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 740–745.
- Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, S., 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294, 1351–1362.
- Boelaert, M., Meheus, F., Sanchez, A., Singh, S.P., Vanlerberghe, V., Picado, A., Meessen, B., Sundar, S., 2009. The poorest of the poor: a poverty appraisal of households affected by visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trop. Med. Int. Health* 14, 639–644.
- Bussacos, A.C., Nakayasu, E.S., Hecht, M.M., Assumpcao, T.C., Parente, J.A., Soares, C.M., Santana, J.M., Almeida, I.C., Teixeira, A.R., 2011. Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals. *J. Proteomics* 74, 1693–1700.
- Charneau, S.E., Junqueira, M., Costa, C.M., Pires, D.L., Fernandes, E.S., Bussacos, A.C., Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., Shevchenko, A., Teixeira, A.R.L., 2007. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. *Int. J. Mass Spectrom.* 268, 265–276.
- Clements, M.F., Gidwani, K., Kumar, R., Hostomska, J., Dinesh, D.S., Kumar, V., Das, P., Muller, I., Hamilton, G., Volfova, V., Boelaert, M., Das, M., Rijal, S., Picado, A., Volf, P., Sundar, S., Davies, C.R., Rogers, M.E., 2010. Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 801–807.
- Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Cheng, L., Laughinghouse, A., Ward, J.M., Elnaïem, D.E., Fischer, L., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2009. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathogens* 5, e1000441.
- Costa, C.M., Sousa, M.V., Ricart, C.A., Santana, J.M., Teixeira, A.R., Roepstorff, P., Charneau, S., 2011. 2-DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*. *J. Proteomics* 74, 1652–1663.
- Choumet, V., Carmi-Leroy, A., Laurent, C., Lenormand, P., Rousselle, J.C., Namane, A., Roth, C., Brey, P.T., 2007. The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. *Proteomics* 7, 3384–3394.
- Djegbe, I., Cornelle, S., Rossignol, M., Demetere, E., Seveno, M., Remoue, F., Corbel, V., 2011. Differential expression of salivary proteins between susceptible and insecticide-resistant mosquitoes of *Culex quinquefasciatus*. *PLoS One* 6, e17496.
- Drame, P.M., Poinssignon, A., Besnard, P., Cornelle, S., Le Mire, J., Toto, J.C., Fomane, V., Dos-Santos, M.A., Sembene, M., Fortes, F., Simondon, F., Carnevale, P., Remoue, F., 2011. Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSGG-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. *PLoS One* 5, e15596.
- Elnaïem, D.E., Meneses, C., Slotman, M., Lanzaro, G.C., 2005. Genetic variation in the sand fly salivary protein SP-15, a potential vaccine candidate against *Leishmania major*. *Insect Mol. Biol.* 14, 145–150.
- Francischetti, I.M., My Pham, V., Mans, B.J., Andersen, J.F., Mather, T.N., Lane, R.S., Ribeiro, J.M., 2005. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 1142–1161.
- Gidwani, K., Picado, A., Rijal, S., Singh, S.P., Roy, L., Volfova, V., Andersen, E.W., Uranw, S., Ostyn, B., Sudarshan, M., Chakravarty, J., Volf, P., Sundar, S., Boelaert, M., Rogers, M.E., 2011. Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: a cluster-randomized trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1296.
- Ghosh, K.N., Mukhopadhyay, J., 1998. The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *Int. J. Parasitol.* 28, 275–281.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M.J., Oliveira, F., Menezes, M.J., Silva, C., de Oliveira, C.I., Miranda, J.C., Elnaïem, D.E., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Brodskyn, C.I., 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7845–7850.
- Gupta, R., Jung, E., Brunak, S., Prediction of N-glycosylation sites in human proteins, in preparation, 2004, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
- Handman, E., 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 229–243.
- Hostomska, J., Rohousova, I., Volfova, V., Stanneck, D., Mencke, N., Volf, P., 2008. Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 443–450.
- Hostomska, J., Volfova, V., Mu, J., Garfield, M., Rohousova, I., Volf, P., Valenzuela, J.G., Jochim, R.C., 2009. Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. *BMC Genomics* 10, 282.
- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R., Brunak, S., 2005. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15, 153–164.
- Kamhawi, S., 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect.* 2, 1765–1773.
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., Sacks, D., 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290, 1351–1354.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M.I., 2012. An insight into the *Phlebotomus perniciosus* saliva by a proteomic approach. *Acta Trop.* 123, 22–30.
- Milleron, R.S., Mutebi, J.P., Valle, S., Montoya, A., Yin, H., Soong, L., Lanzaro, G.C., 2004. Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 286–293.
- Molina, R., 1991. Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Res. Rev. Parasitol.* 51, 87–89.
- Nieves, E., Buelvas, N., Rondon, M., Gonzalez, N., 2011. The salivary glands of two sand fly vectors of *Leishmania*: *Lutzomyia migonei* (Franca) and *Lutzomyia ovallesi* (Ortiz) (Diptera: Psychodidae). *Biomedica* 30, 401–409.
- Oleaga, A., Escudero-Población, A., Camafeita, E., Pérez-Sánchez, R., 2007. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1149–1159.
- Poinssignon, A., Remoue, F., Rossignol, M., Cornelle, S., Courtin, D., Grebaut, P., Garcia, A., Simondon, F., 2008. Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: an epidemiologic marker of exposure to *Glossina* bites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 750–753.
- Prates, D.B., Santos, L.D., Miranda, J.C., Souza, A.P., Palma, M.S., Barral-Netto, M., Barral, A., 2008. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *J. Med. Entomol.* 45, 409–413.
- Ribeiro, J.M., 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 32, 463–478.
- Ribeiro, J.M., Francischetti, I.M., 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 73–88.
- Rogers, K.A., Titus, R.G., 2003. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol.* 25, 127–134.
- Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbek, Y., Volf, P., 2005. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493–499.
- Rohousova, I., Volf, P., 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol.* 53, 161–171.
- Rohousova, I., Volfova, V., Nova, S., Volf, P., 2012a. Individual variability of salivary gland proteins in three *Phlebotomus* species. *Acta Trop.* 122, 80–86.
- Rohousova, I., Subrahmanyam, S., Volfova, V., Mu, J., Volf, P., Valenzuela, J.G., Jochim, R.C., 2012b. Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1660.
- Samuelson, J., Lerner, E., Tesh, R., Titus, R., 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.* 173, 49–54.
- Schwarz, A., Sternberg, J.M., Johnston, V., Medrano-Mercado, N., Anderson, J.M., Hume, J.C., Valenzuela, J.G., Schaub, G.A., Billingsley, P.F., 2009. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int. J. Parasitol.* 39, 1021–1029.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Souza, A.P., Andrade, B.B., Aquino, D., Entringer, P., Miranda, J.C., Alcantara, R., Ruiz, D., Soto, M., Teixeira, C.R., Valenzuela, J.G., de Oliveira, C.I., Brodskyn, C.I., Barral-Netto, M., Barral, A., 2010. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e649.
- Teixeira, C., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., Seitz, A., Elnaïem, D.E., Caldas, A., de Souza, A.P., Brodskyn, C.I., de Oliveira, C.I., Mendonça, I., Costa, C.H., Volf, P., Barral, A., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2010. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e638.
- Theodos, C.M., Ribeiro, J.M., Titus, R.G., 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect. Immun.* 59, 1592–1598.
- Titus, R.G., Ribeiro, J.M., 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239, 1306–1308.
- Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Garfield, M.K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Sacks, D.L., Ribeiro, J.M., 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J. Exp. Med.* 194, 331–342.
- Valenzuela, J.G., 2002. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1199–1209.
- Vitorino, R., Lobo, M.J., Ferrer-Correia, A.J., Dubin, J.R., Tomer, K.B., Domingues, P.M., Amado, F.M., 2004. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 4, 1109–1115.
- Vlkova, M., Rohousova, I., Drahota, J., Stanneck, D., Kruehwagen, E.M., Mencke, N., Otranto, D., Volf, P., 2011. Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1344.
- Volf, P., Tesarova, P., Nohynkova, E.N., 2000. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Med. Vet. Entomol.* 14, 251–256.
- Volf, P., Rohousova, I., 2001. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122 (Pt 1), 37–41.
- Wasinpiyamongkol, L., Patramool, S., Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Doucoure, S., Mouchet, F., Seveno, M., Remoue, F., Demetere, E., Brizard, J.P., Jouin, P., Biron, D.G., Thomas, F., Misse, D., 2009. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics* 10, 1906–1916.
- WHO, 2010. Control of the Leishmaniasis. World Health Organization, Geneva, Tech Rep Ser n°: 949.
- Wilkinson, B., Gilbert, H.F., 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1699, 35–44.

## Research Article

# Molecular and Immunogenic Properties of Apyrase SP01B and D7-Related SP04 Recombinant Salivary Proteins of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid, Spain

Inés Martín-Martín, Ricardo Molina, and Maribel Jiménez

Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda-Pozuelo s/n, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Maribel Jiménez; [mjimenez@isciii.es](mailto:mjimenez@isciii.es)

Received 12 April 2013; Revised 26 July 2013; Accepted 16 August 2013

Academic Editor: Hirotaka Sakamoto

Copyright © 2013 Inés Martín-Martín et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sand fly salivary proteins are on the spotlight to become vaccine candidates against leishmaniasis and to markers of exposure to sand fly bites due to the host immune responses they elicit. Working with the whole salivary homogenate entails serious drawbacks such as the need for maintaining sand fly colonies and the laborious task of glands dissection. In order to overcome these difficulties, producing recombinant proteins of different vectors has become a major task. In this study, a cDNA library was constructed with the salivary glands of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid, Spain, the most widespread vector of *Leishmania infantum* in the Mediterranean basin. Analysis of the cDNA sequences showed several polymorphisms among the previously described salivary transcripts. The apyrase SP01B and the D7-related protein SP04 were successfully cloned, expressed in *Escherichia coli*, and purified. Besides, recombinant proteins were recognized by sera of hamsters and mice previously immunized with saliva through the exposure to uninfected sand fly bites. These results suggest that these two recombinant proteins conserved their immunogenic properties after expression in a prokaryote system. Therefore, this work contributes to expand the knowledge of *P. perniciosus* saliva that would be eventually used for the development of tools for vector control programs.

## 1. Introduction

Leishmaniasis is still one of the most important vector-borne diseases in terms of incidence as two million people per year are affected worldwide [1]. The causative agent of the aforementioned disease is *Leishmania* spp., a flagellate parasite which is transmitted by infected phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) during blood feeding. Arthropod saliva is actively involved in the transmission of pathogens to its host as it contains a complex cocktail of antihemostatic and immunomodulatory molecules that are inoculated into the host skin during blood feeding of both infected and noninfected sand flies [2]. Concretely, sand fly salivary components are known to play an important role in the establishment of *Leishmania* spp. infection [3]. In the last years, research on sand fly salivary proteins has greatly increased, suggesting that salivary proteins could be successfully assayed both as anti-*Leishmania* vaccine candidates and as markers

of exposure to sand flies [4, 5]. As hosts are bitten, they develop both humoral and cellular responses against sand fly saliva [6]. Moreover, a positive correlation has been observed between the number of bites and antibody levels [4, 7, 8]. Therefore, host exposure to sand flies can be measured by evaluating humoral responses against salivary antigens. This methodology is being applied by mainly using salivary gland extracts [4, 9–12]. Recombinant salivary proteins have already been produced for sand fly species such as *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* [4, 8, 10, 11, 13, 14]. Some of these proteins have been already proved as good markers of exposure [11, 14]. However, since salivary proteins display high specificity, it is necessary to produce immunogenic salivary proteins for other sand fly species.

In the western Mediterranean basin, *Leishmania infantum* is mainly transmitted by *Phlebotomus perniciosus* in an anthroponotic cycle where dogs have been traditionally considered the main reservoir [1]. However, other

potential reservoirs such as hares (*Lepus granatensis*) have been recently involved in *L. infantum* transmission at a human leishmaniasis outbreak in Madrid [15, 16]. As a part of a management plan to control the disease in this environment, measuring exposure of reservoirs to the main vector involved, *P. perniciosus*, through the detection of anti-saliva antibodies, would be useful to evaluate whether actions taken to reduce leishmaniasis have been effective as previously done in India and Nepal [9].

In previous studies, our group described immunogenic salivary proteins of *P. perniciosus* and *P. argentipes*. These proteins were identified through the combination of two-dimensional electrophoresis and Western blot with sera of mice and hamsters experimentally exposed to uninfected sand flies [17, 18]. Therefore, in this study, our aim was to obtain some of the *P. perniciosus* salivary immunogenic molecules as recombinant proteins, through a cDNA library from salivary glands, from *P. perniciosus* and subsequent studies of the immunogenicity of the purified salivary proteins. Moreover, several polymorphisms between transcripts of the *P. perniciosus* cDNA from Madrid were compared to the previously annotated ones that belonged to specimens from Italy [19].

## 2. Material and Methods

**2.1. Sand Flies and Salivary Glands Collection.** *P. perniciosus* sand flies were maintained at 27°C and 17:7 light-darkness photoperiod at the Medical Entomology Unit of the Instituto de Salud Carlos III (ISCIH), Madrid, Spain. This colony was established in 1987 from sand flies captured at a leishmaniasis endemic area of Madrid [20]. Salivary glands from recently emerged up to 1-day-old sand flies were dissected and stored in RNAlater (Invitrogen, San Diego, CA).

**2.2. Salivary Gland cDNA Library Construction.** A cDNA library was constructed with mRNA isolated from 165 salivary glands using the Micro-FastTrack mRNA isolation kit (Invitrogen, San Diego, CA). After isolation, mRNA was reverse transcribed to cDNA and subsequently amplified by PCR following the instructions of the SMART cDNA library construction kit (Clontech). cDNAs were then fractionated by column chromatography before cloning. Directional cloning into  $\lambda$ TriplEx2 vector (Clontech) was achieved through *Sfi*IAB flanking sites incorporated by PCR during the cDNA amplification. The pool of cDNAs cloned into  $\lambda$ TriplEx2 vector was packaged into phage particles following the manufacturer's instructions (Gigapack III Gold Packaging Extract, Agilent). The resulting cDNA library was amplified following general molecular biology protocols [21].

**2.3. cDNA Library Screening, Sequencing, and Bioinformatics.** After plating the library by infecting log phase XL1-blue cells (Clontech) in the presence of  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) and 5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal), white plaques were randomly picked from the agar plates and analyzed by PCR using  $\lambda$ TriplEx2 primers

(forward: 5'-TCCGAGATCTGGACGAGC-3' and reverse: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'). Recombinant phages which presented the greatest insert sizes were converted into pTriplEx2 plasmid through Cre recombinase-mediated site-specific recombination. Plasmid DNA was then isolated and sequenced using the primer 5' $\lambda$ TriplEx LD: 5'-CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT-3' and the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (PE Biosystems, Foster City, CA) in an ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Both strains of clones of interest were subsequently sequenced with reverse primer 3' $\lambda$ TriplEx LD: 5'-ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCC-3'. DNA electropherograms were manually inspected and corrected using Chromas program (McCarthy, Queensland, Australia). Sequence identities were determined by BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). DNASTAR software (Lasergene, Madison, WI) was used for nucleotidic alignments (SeqMan program), and protein features were assigned by Protean tools. Amino acid sequences were aligned with ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) and refined using Boxshade server ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). Glycosylation sites were predicted using NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) and NetOGlyc 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) for N- and O-glycosylation sites, respectively [22, 23]. Phosphorylation sites prediction was done using NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) [24].

**2.4. Cloning of Salivary Gland cDNAs.** Salivary coding sequences of the apyrase SP01B and the D7-related protein SP04 were amplified by PCR from the corresponding pTriplEx2 plasmids using specific primers. cDNAs were cloned into PCR4-TOPO plasmid and transformed into TOP10 competent cells (Invitrogen, San Diego, CA). Restriction sites were incorporated by PCR from the recombinant PCR4-TOPO vector. *Sal*I (forward and reverse) was used as a restriction site (represented as bold letters): SP01B: 5'-**GTC-GACATGATATTGTTGAAATTG**-3' and 5'-**GTCGACTTACTTAATTCCTTTGGG**-3' and SP04: 5'-**GAGAGAGTCGACATGAATACCTTATTG**-3' and 5'-**GAGAGAGTCGACTAATAATTTGTTAATG**-3'. The primers were manually designed according to the sequences obtained. All primers were synthesized at the Genomic Unit of ISCIH. The high-fidelity polymerase *Pfu* Turbo Hotstart (Stratagene, La Jolla, CA) was used in order to avoid point mutations. Coding sequences were excised from the plasmid by enzymatic digestion and ligated into pQE31 vector (Qiagen, Hilden, Germany). The recombinant expression vectors pQE31 were transformed into competent M15 (Qiagen, Hilden, Germany). All construction steps were verified by sequencing.

**2.5. Expression and Purification of Recombinant Salivary Proteins.** Different expression and purification conditions were tested in order to optimize the processes for these specific proteins. Cultures of M15 cells that contained the pQE31 recombinant plasmid for SP01B and SP04 were grown in Luria-Bertani medium containing ampicillin (100  $\mu$ g/mL).



Protein expression was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 1 mM, and cultures were grown at 37°C for 3 hours. Bacterial cells were collected by centrifugation and lysed in 6 M guanidine hydrochloride, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, and pH 8. Cell debris was then separated by centrifugation, and the resultant supernatant was submitted to affinity chromatography by using Ni-NTA Superflow resin in prepacked 5 mL columns. Proteins were purified under denaturing conditions following the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Protein refolding was done by removing urea through dialysis against PBS (SnakeSkin Dialysis Tubing 10 kDa MWCO, Thermo Scientific, Goettingen, Germany). Proteins were then concentrated using the stirred ultrafiltration cell with 10 kDa MWCO membranes (Millipore, Bedford, MA) and quantified by gel in comparison with BSA standards.

**2.6. Western Blotting.** Western blots were performed following standard protocols. Briefly, 1 µg of recombinant protein was separated by SDS-PAGE and electroblotted onto a PVDF membrane which was incubated overnight in blocking buffer (3% BSA, Sigma, St. Louis, CA; 2% ECL Blocking reagent, Amersham, Piscataway, NJ). After washing, membranes were incubated for 2 hours with pooled sera (1:25) of either hamsters that were immunized against *P. perniciosus* saliva by the bite of uninfected sand flies through the exposure to 100 sand flies on a weekly schedule over 10 weeks [17] or mice exposed 13 times to 150 *P. perniciosus* (unpublished). Goat anti-hamster IgG and goat anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibodies (1:3500, Southern Biotech, Birmingham, AL and 1:500, AbD Serotec, resp.) were used, and immunogenic proteins were visualized by CN/DAB reagent following the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, Goettingen, Germany). Experiments with sera of immunized and nonimmunized animals were carried out in parallel. For His-tag detection, mouse anti-RGS-His antibodies (1:3000, Qiagen, Hilden, Germany) were used in combination with the goat anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibodies (AbD Serotec).

### 3. Results and Discussion

**3.1. cDNA Library Analysis.** The expression library showed a titer of  $3.6 \times 10^6$  and 17.6% of nonrecombinant clones. The amplified library displayed a larger number of independent clones ( $1.2 \times 10^{12}$ ) and a low number of nonrecombinant clones (1.92%). Therefore, this amplified library was used for subsequent analysis and cloning processes. 201 white plaques were randomly picked from IPTG/X-Gal plates and analyzed by PCR. 36 out of 201 plaques showing the greatest insert size were selected, converted into pTriplEx2, and further sequenced. Among the 25 complete transcripts, they were identified mostly as apyrases (SP01, SP01B), D7-related proteins (SP04, SP04B), yellow proteins (SP03B), ParSP25-like proteins (SP08), lufaxin-like proteins (SP06), and PpSP15-like proteins (SP02, SP09, and SP11). Complete sequences were annotated at EMBL nucleotide database, and NCBI accession numbers are shown in Table 1.

Overall, high degree of conservancy was found among the salivary transcripts we sequenced, and their best matches available in nonredundant databases were obtained from a cDNA library from *P. perniciosus* from Italy [19]. This finding is in contrast to the high level of divergence found for the salivary protein maxadilan of *L. longipalpis* from distinct locations [25].

In the case of maxadilan, the high level of polymorphisms elicits variant-specific antibodies with little cross-reactivity, and it has been suggested that sand flies may have evolved diversity in maxadilan as a strategy to evade the host immune response against this essential vasodilator peptide that facilitates blood feeding of *L. longipalpis*. Balancing selection might be maintaining many maxadilan alleles with equivalent vasodilatory potencies [25, 26]. On the other hand, our results match the description of a high degree of conservancy among salivary transcripts in two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sand fly populations in Africa, and it was suggested that sand flies belonging to the genus *Phlebotomus* show greater degree of conservancy than *Lutzomyia* spp. [27]. Following this trend, in previous experiments of our group, we did not find qualitative differences in the salivary protein profile among three colonies of *P. perniciosus* collected from different areas of Spain and reared under identical laboratory conditions [17]. Moreover, a recent comparison between transcripts from cDNA libraries constructed with *P. papatasi* strains from Israel and Tunisia showed a high level of conservancy [28]. Indeed, the high degree of conservancy found between the salivary transcripts of *P. perniciosus* from Spain and Italy may be a reflection of little evolutionary pressure from the host immune response on the analyzed salivary proteins in contrast with previous observations of maxadilan. Moreover, studies on the evolution of apyrase from several *Phlebotomus* species show high degree of conservancy, and the geographical pattern of genetic variation was consistent with neutral demographic processes mainly regional isolation and isolation by distance resulting from the changes that occurred during the late Pleistocene [29]. In the case of secretory salivary proteins, it is possible that the presence of multiple copies reflects an adaptation to increase the production of these important proteins for sand flies [30]. Salivary peptides often occur within and between gene families, for which there is evidence for overlapping functions [19]. Redundancy is a common property among salivary proteins of sand flies and other arthropods [17, 31], and it has been suggested that it might play a role in ensuring blood-feeding success [32].

Therefore, several polymorphisms were found when comparing the sequenced salivary transcripts in this work with their corresponding annotated transcripts. Although these polymorphisms are expected among populations, we aimed to *in silico* study in detail whether these polymorphisms could lead to changes in phosphorylation and glycosylation processes, structure, immunogenic properties, and functionality through bioinformatics-predictive programs. In order to confirm these single nucleotide polymorphisms (SNPs) both 5' and 3' strands were sequenced and aligned. Most of the SNPs were located among the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) which are known for the high variability [33].

TABLE 1: Polymorphisms between the current cDNAs sequenced from salivary glands of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid and their corresponding best matches in NR database.

Protein name/NCBI accession number	Best match to NR nucleotide database	Protein family	BLASTn identities		Nucleotide polymorphisms <sup>a</sup>		Aminoacidic polymorphisms <sup>a</sup>		Changes in glycosylation sites <sup>c</sup>		Changes in phosphorylation sites <sup>d</sup>	Changes in protein structure <sup>e</sup>
			Gaps	Identities	UTRs	CDS	Antigenic regions <sup>b</sup>	Nonantigenic regions <sup>b</sup>	N	O		
SP01 (HE974344)	PperSP01 (DQ192490)	Apyrase	0/999 (0%)	982/999 (98%)	0	17	1	1	No	No	Yes	No
SP01B (HE974345)	PperSP01B (DQ192491)	Apyrase	16/1116 (1%)	1089/1116 (98%)	3	8	4	2	No	No	Yes	Yes
SP02 (HE985074)	PperSP02 (DQ150620)	PpSP15-like	0/522 (0%)	513/522 (98%)	3	6	2	1	No	No	Yes	No
SP02 (HE985075)	PperSP02 (DQ150620)	PpSP15-like	1/523 (0%)	513/523 (98%)	3	6	3 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	No	No	Yes	Yes
SP02 (HE985076)	PperSP02 (DQ150620)	PpSP15-like	2/524 (0%)	511/524 (98%)	2	9	5	1	No	No	Yes	No
SP02 (HE985077)	PperSP02 (DQ150620)	PpSP15-like	3/525 (0%)	511/525 (97%)	1	10	4	1	No	No	Yes	No
SP03B (HE974346)	PperSP03B (DQ150622)	Yellow protein	0/1182 (0%)	1165/1182 (99%)	0	17	4	4	No	No	Yes	Yes
SP04 (HE980444)	PperSP04 (DQ150623)	D7-related	0/838 (0%)	821/838 (98%)	5	12	4	1	No	No	No	No
SP04B (HE980443)	PperSP04B (DQ150624)	D7-related	2/824 (0%)	761/824 (92%)	9	52	22	5	No	No	Yes	Yes
SP06 (HE970770)	PperSP06 (DQ153100)	Lufaxin	1/1031 (0%)	1011/1031 (98%)	8	11	3	1	No	No	Yes	Yes
SP08 (HE974347)	PperSP08 (DQ153102)	ParSP25-like	0/774 (0%)	766/774 (99%)	0	8	3	1	No	No	Yes	Yes
SP09 (HE966456)	PperSP09 (DQ153103)	PpSP15-like	0/500 (0%)	477/500 (95%)	7	16	8	1	No	No	Yes	Yes
SP11 (HE974348)	PperSP11 (DQ153105)	PpSP15-like	10/483 (2%)	458/483 (95%)	11	4	1	0	No	No	No	No
Hypothetical protein P119 (HE985078)	<i>Aedes aegypti</i> hypothetical protein (XM_001663068)	Unknown	0/496 (0%)	402/496 (81%)	18	76	8	1	No	Yes	Yes	Yes

<sup>a</sup> Nucleotide and aminoacid polymorphisms between the current sequenced cDNA clones and their best *P. perniciosus* salivary cDNA matches (BLASTn and ClustalW for nucleotide and amino acid alignments). The number of nucleotide polymorphisms fits the values of nonidentical nucleotides (column 5) minus the gaps (column 4).

<sup>b</sup> Protein antigenic regions were predicted by *in silico* bioinformatics (Jameson-Wolf index, Protean program, DNASTAR, Lasergene).

<sup>c</sup> N-, and O-glycosylation sites prediction performed with NetNGlyc 1.0 Server and NetOGlyc 3.1 Server.

<sup>d</sup> Phosphorylation sites prediction performed with NetPhos 2.0 Server.

<sup>e</sup> Alpha helix and beta sheet locations were predicted by Garnier-Robson algorithm (Protean program, DNASTAR, Lasergene).

<sup>f</sup> Two deletions in the nucleotide sequence of SP02 (HE985075) lead to a switch of the reading frame of the gene.

On the other hand, several SNPs were found on the translated region, and some of them resulted in amino acid changes. Substitutions in coding regions may influence protein structure, and therefore electrostatic forces and ligand affinity may involve changes in protein function [34]. Prediction of locations of alpha and beta regions, as well as the antigenic index and phosphorylation sites for the sequenced proteins, confirmed the presence of several changes from their best matches in databases as shown in Table 1. Polymorphisms found in SP01B and SP04 resulted in changes of the antigenic index from positive to negative values and vice versa when compared to the Italian strain (located at T<sup>166</sup> for SP01B and R<sup>51</sup> for SP04). In the case of phosphorylation residues, most of the analyzed transcripts presented changes regarding to the *P. perniciosus* Italian strain. For instance, in the apyrase sequence SP01B, the amino acids T<sup>163</sup> and Y<sup>148</sup> were predicted to be phosphorylated in the Italian strain but not in the Spanish one (Figure 1). Although point mutations can change the ability of the protein to bind carbohydrates, the SNPs were not located at the N- and O-glycosylation sites as *in silico* predicted through bioinformatic programs (Table 1).

A description of the salivary proteins from *P. perniciosus* Spanish strain is listed below.

**3.1.1. Apyrases.** SP01 and SP01B belong to the protein family of *Cimex* apyrases which are typically found in sand flies and bed bugs. These enzymes hydrolyze nucleotide di- and triphosphates to orthophosphates and mononucleotides and act as potent antihaemostatic factors [13]. Transcripts coding for SP01 and SP01B in our library are conserved with the respective genes from *P. perniciosus* from Italy (Figure 1).

**3.1.2. Odorant-Binding-Related Proteins.** In sand flies two salivary protein families are included among the odorant-binding protein superfamily; the D7-related proteins and the PpSP15-like proteins [35, 36].

The SP04 and SP04B are classified as D7-related proteins. D7-related proteins are widely distributed in the saliva of haematophagous Diptera. One of the first cloned proteins from the saliva of *Aedes aegypti* was arbitrarily called D7 [37], and since then similar proteins have been identified in the saliva of other Nematocera such as mosquitoes, black flies, *Culicoides*, and sand flies [36]. Further studies showed that the odorant-binding-protein superfamily had a multigene organization and due to gene duplication processes produced two distinct forms of proteins called long and short forms [38]. Sand fly D7-related proteins are related to the long form [39].

In mosquitoes, D7 proteins are able to bind biogenic amines and leukotrienes, in addition to various components of the coagulation cascade, thus interfering with the haemostatic and host immune responses [40]. The role they play in sand flies has not yet been clarified however, their great representation at both transcriptomic and proteomic levels [17–19, 28, 41] and the conservation of the cysteinyl leukotrienes-binding motifs [42] suggest an involvement in counteracting the coagulation cascade [41]. Concretely,

the binding site for thromboxane A2 (TXA2) analogs in *A. stephensi* D7 protein (GenBank ID: 315583502) lies in a hydrophobic pocket in the N-terminal domain which accommodates a large portion of the fatty acid chain. Tyrosine at position 52 in *A. stephensi* D7 protein is known to stabilize the TXA2 analogs through hydrogen bonds [42]. In *A. aegypti* D7 protein (GenBank ID: PDB:3DXL\_A), a mutation of this position from tyrosine to phenylalanine leads to a failure to bind TXA2 analogs [43]. In sand flies, most of the D7-related proteins conserved a residue of tyrosine in this position (Y<sup>65</sup>); however, both SP04 from *P. perniciosus* Spanish and Italian strains contain a phenylalanine in that position (Figure 2). Moreover, in the D7-related protein SP04 from the *P. perniciosus* Spanish strain (GenBank ID: CCK73754), one of the cysteinyl leukotriene-binding motifs located at R<sup>51</sup> showed a polymorphism (Figure 2). However, without experimental confirmation of the functionality of D7-related proteins in sand flies, these changes in the binding motif remain to be elucidated. The D7-related protein SP04B from the Spanish strain (GenBank ID: HE980443) showed two deletions between T<sup>546</sup> and A<sup>547</sup> that lead to a switch in the reading frame of the gene and an earlier stop codon (<sup>546</sup>TAG<sup>548</sup>, data not shown). The predicted protein should appear in the polyacrylamide gels at a theoretical molecular weight (Mw) of 20.7 kDa, however, it had not been found at that Mw [17, 19]. In order to check whether all SP04B clones present in this library included this mutation, we amplified the SP04B gene with primers flanking the CDS, the cDNA library as a template, and further sequenced the extracted DNA. We found the complete sequence for SP04B without that mutation, confirming that in our library both clones are present.

SP02, SP09, and SP11 belong to the PpSP15-like family which have been found only in sand flies and represent the most abundant family among sand fly salivary proteins [19, 41, 44]. PpSP15-like proteins were described as highly polymorphic and derived from a multicopy gene family [19, 30]. The sequences of these proteins show a high degree of variability in addition to certain conserved cysteine residues [28]. In *P. papatasi*, large numbers of variants of the PpSP15 gene were observed, and differences between alleles were small and resulted in only few amino acid substitutions [30]. Therefore, polymorphisms within transcripts are expected, as shown in other species. Some transcripts, such as SP02, were found to be highly representative within the cDNA library (Figure 3). One of the sequenced clones of SP02 (GenBank ID: HE985075) presented a single nucleotide deletion between A<sup>340</sup> and T<sup>341</sup> that leads to a switch in the reading frame of the gene. As a consequence, the putative-translated protein (GenBank ID: CCM43815) would differ in sequence and length since it contains an earlier stop codon (<sup>417</sup>TGA<sup>419</sup>, Figure 3). Although these changes do not seem to affect its immunogenicity, as the polymorphisms were found within an area of low antigenicity according to the Jameson-Wolf index (data not shown), the function of this protein family remains unknown. Interestingly, immunization with *P. papatasi* SP15 protected mice from cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* [45].



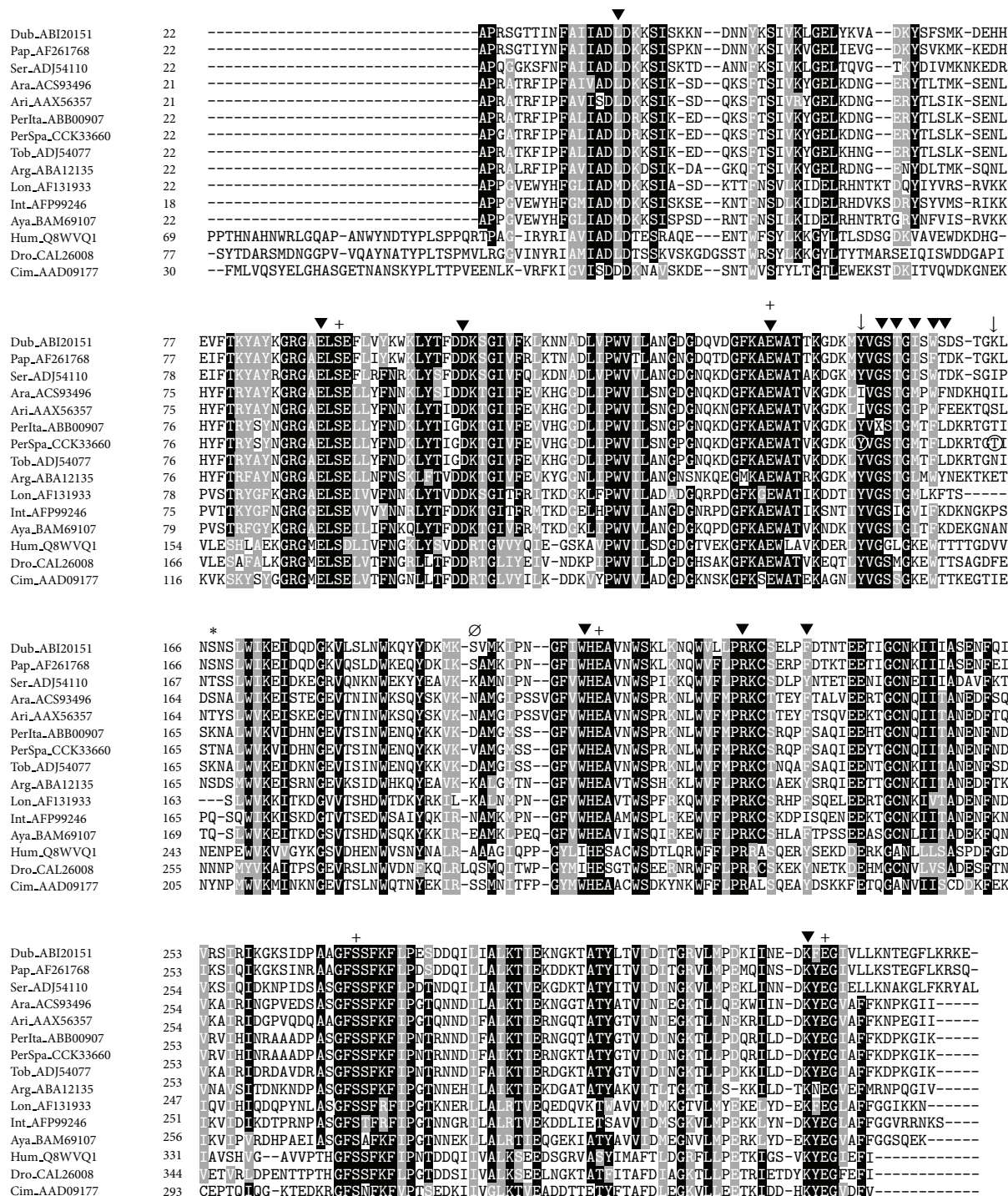


FIGURE 1: Multiple sequence alignment of apyrases from sand flies and other related sequences: *L. longipalpis* (Lon), *Lutzomyia intermedia* (Int), *Lutzomyia ayacuchensis* (Aya), *Phlebotomus arabicus* (Ara), *Phlebotomus ariasi* (Ari), *P. perniciosus* Italian strain (PerIta), *P. perniciosus* Spanish strain (PerSpa), *Phlebotomus tobbi* (Tob), *Phlebotomus argentipes* (Arg), *P. duboscqi* (Dub), *P. papatasi* (Pap), *Phlebotomus sergenti* (Ser), *Homo sapiens* (Hum), *Drosophila melanogaster* (Dro), and *Cimex lectularius* (Cim). Accession numbers are indicated in the sequence name. Sequences without a signal peptide were aligned with ClustalW and refined using Boxshade server, and the percentage of the identities or similarities that must agree for shading was set at 80%. Black background shading represents identical amino acids, and grey shading designates similar amino acids while white shading indicates no similarity. (\*) and (O) indicate changes in the prediction of the antigenic index and secondary structure, respectively, between *P. perniciosus* Spanish and Italian strains as performed by Protean (DNASTAR, Lasergene). (↓) signs above amino acids indicate changes in phosphorylation sites as predicted by NetPhos 2.0 Server, and the amino acid affected by the prediction on the phosphorylation site is encircled. Binding sites of nucleotides and  $\text{Ca}^{2+}$  are represented by (▼) and (+), respectively, as predicted for the human apyrase [52].

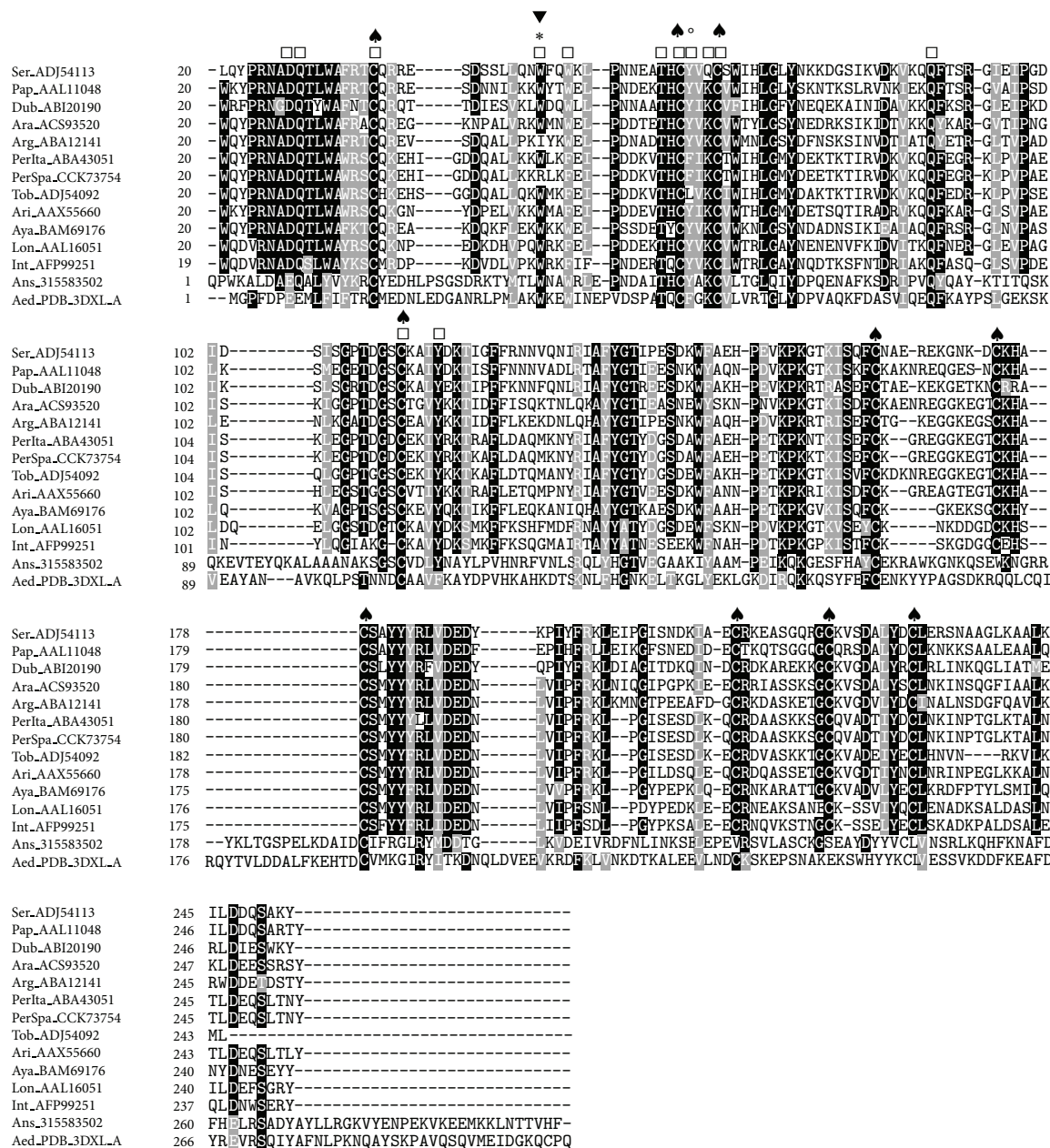


FIGURE 2: Multiple sequence alignment of D7-related proteins from sand flies and other related sequences: *L. longipalpis* (Lon), *L. intermedia* (Int), *L. ayacuchensis* (Aya), *P. arabicus* (Ara), *P. ariasi* (Ari), *P. perniciosus* Italian strain (PerIta), *P. perniciosus* Spanish strain (PerSpa), *P. tobbi* (Tob), *P. argentipes* (Arg), *P. duboscqi* (Dub), *P. papatasi* (Pap), *P. sergenti* (Ser), *A. stephensi* (Ans), and *A. aegypti* (Aed). Accession numbers are indicated in the sequence name. Sequences without a signal peptide were aligned with ClustalW and refined using Boxshade server, and the percentage of the identities or similarities that must agree for shading was set at 80%. Black background shading represents identical amino acids, and grey shading designates similar amino acids, while white shading indicates no similarity. (\*) indicates changes in the prediction of the antigenic index between *P. perniciosus* Spanish and Italian strains as performed by Protean (DNASTAR, Lasergene). (♣) denotes conserved cysteine residues. The cysteinyl leukotriene-binding motif is indicated by (□) [42], and the mutation of one of the amino acids that integrate this motif is designated by (▼). Tyrosine in position 52 in *A. stephensi* stabilizes TXA2 analogs and is highlighted with (♠).

**3.1.3. Yellow Proteins.** The yellow proteins are found in the saliva of insects, and they were named after observations in *Drosophila*, where mutation of a given gene gave a yellow phenotype, indicating that they are involved in melanization processes and pigmentation [46]. In sand flies, yellow proteins are widely represented at both transcriptomic

and proteomic levels, showing molecular weights around 41–45 kDa and a wide range of isoelectric points [17, 19, 35, 41, 44]. Recently, it has been demonstrated that yellow proteins from *L. longipalpis* are able to bind and therefore inhibit the effects of several biogenic amines such as serotonin, norepinephrine, epinephrine, and histamine. Therefore,



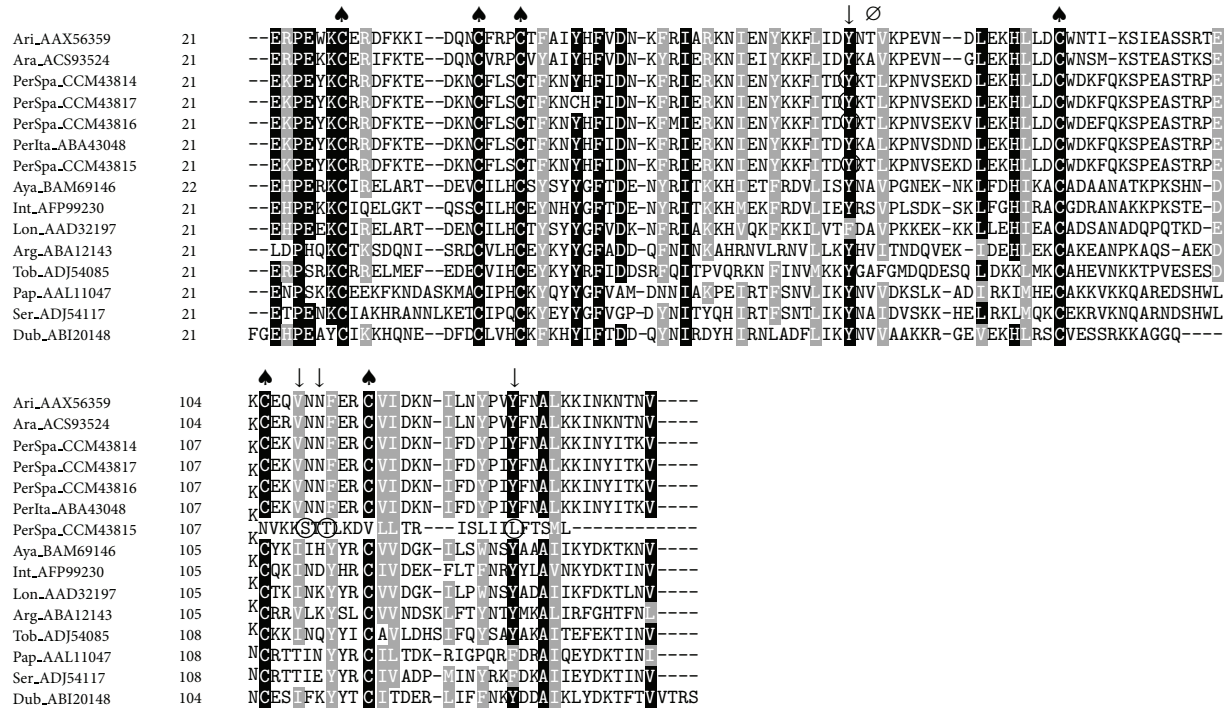


FIGURE 3: Multiple sequence alignment of PpSP15-like proteins from sand flies: *L. longipalpis* (Lon), *L. intermedia* (Int), *L. ayacuchensis* (Aya), *P. arabicus* (Ara), *P. ariasi* (Ari), *P. perniciosus* Italian strain (PerIta), *P. perniciosus* Spanish strain (PerSpa), *P. tobbi* (Tob), *P. argentipes* (Arg), *P. duboscqi* (Dub), *P. papatasi* (Pap), and *P. sergenti* (Ser). Accession numbers are indicated in the sequence name. Sequences without a signal peptide were aligned with ClustalW and refined using Boxshade server, and the percentage of the identities or similarities that must agree for shading was set at 80%. Black background shading represents identical amino acids, and grey shading designates similar amino acids, while white shading indicates no similarity. (O) indicates changes in the prediction of the secondary structure between *P. perniciosus* Spanish and Italian strains as performed by Protean (DNASTAR, Lasergene). (↓) signs above amino acids indicate changes in phosphorylation sites as predicted by NetPhos 2.0 Server, and the amino acid affected by the prediction on the phosphorylation site is encircled. (▲) denotes conserved cysteine residues.

they act as vasodilators and as inhibitors of platelet activation, itch, and pain [47]. Yellow proteins are conserved among sand fly species as shown in Figure 4.

**3.1.4. Par25-Like Proteins.** This protein family displays a molecular weight around 25 kDa and an isoelectric point of 4.4–5 due to the great proportion of acidic residues (Figure 5). There are conserved regions rich in certain amino acid residues, and this protein family has been identified in *Adlerius* (*P. arabicus*), where it represents the second most abundant protein family in the salivary glands cDNA, and *Larrousius* (*P. ariasi*, *P. perniciosus*, and *P. tobbi*) [19, 41, 44, 48]. Although its function is still unknown, several members of the sand fly ParSP25-like family stand to be highly immunogenic. Concretely, *P. perniciosus* SP08 is highly recognized by the sera of mice, hamsters, and dogs exposed to the bites of this vector [7, 17]. Moreover, a plasmid encoding *P. ariasi* SP25 strongly elicits both humoral and delayed-type hypersensitivity responses in mice [48].

**3.1.5. Lufaxin-Like Proteins.** SP06 from *P. perniciosus* Spanish strain (GenBank ID: CCK18305), a component of the 33 kDa family protein, shares 44% sequence identity with lufaxin from *L. longipalpis* (GenBank ID: AAS05319, Figure 6) whose

antithrombotic and anti-inflammatory effects have been recently described [49]. These alkaline proteins of molecular weight around 32–36 kDa seem to be specific for sand flies, and they have been identified in species of both genera *Phlebotomus* and *Lutzomyia* [19, 28, 35, 41, 49–51].

The transcript coding for a hypothetical protein P119 (GenBank ID: HE985078) was found among the sequenced cDNAs. This predicted protein shares homology with several hypothetical proteins of different insects, being the best match from *A. aegypti* (GenBank ID: XM\_001663068). However, since it lacks signal peptide, it will not probably be secreted into the salivary gland lumen and would possibly be found in the cells of the gland walls.

**3.2. Cloning, Expression, and Purification of Salivary Proteins.** cDNA sequences of the salivary proteins SP01B and SP04 were successfully cloned in frame into expression vectors as confirmed by sequencing. Different expression conditions of the apyrase SP01B (37.3 kDa) and the D7-related protein SP04 (28.9 kDa) were assayed, and the best results were obtained when we induced cultures with 1 mM IPTG during 3 hours at 37°C. Batch purification of both 6xHis-tagged proteins was achieved by His-tag affinity chromatography using Super flow Ni-NTA resin under denaturing conditions. Adequate

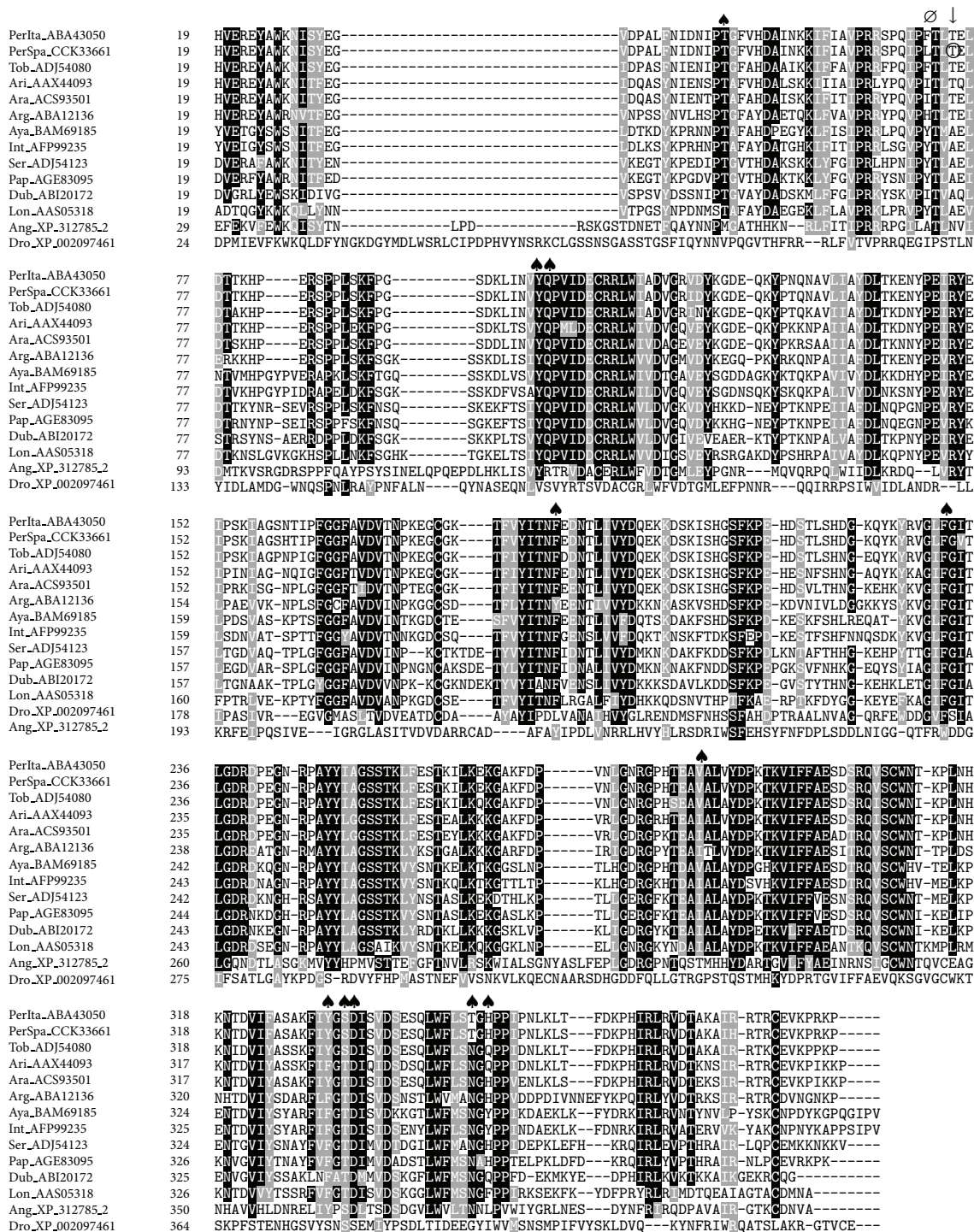


FIGURE 4: Multiple sequence alignment of yellow proteins from sand flies and other related sequences: *L. longipalpis* (Lon), *L. intermedia* (Int), *L. ayacuchensis* (Aya), *P. arabicus* (Ara), *P. ariasi* (Ari), *P. perniciosus* Italian strain (PerIta), *P. perniciosus* Spanish strain (PerSpa), *P. tobbi* (Tob), *P. argentipes* (Arg), *P. duboscqi* (Dub), *P. papatasi* (Pap), *P. sergenti* (Ser), *Anopheles gambiae* (Ang), and *D. melanogaster* (Dro). Accession numbers are indicated in the sequence name. Sequences without a signal peptide were aligned with ClustalW and refined using Boxshade server, and the percentage of the identities or similarities that must agree for shading was set at 80%. Black background shading represents identical amino acids, and grey shading designates similar amino acids, while white shading indicates no similarity. (O) indicates changes in the prediction of the secondary structure between *P. perniciosus* Spanish and Italian strains as performed by Protean (DNASTAR, Lasergene). (↓) signs above amino acids indicate changes in phosphorylation sites as predicted by NetPhos 2.0 Server, and the amino acid affected by the prediction on the phosphorylation site is encircled. (▲) denotes conserved amino acids contained in the ligand-binding pocket.



FIGURE 5: Multiple sequence alignment of Par25-like proteins from sand flies: *P. arabicus* (Ara), *P. ariasi* (Ari), *P. perniciosus* Italian strain (PerIta), and *P. perniciosus* Spanish strain (PerSpa), *P. tobbi* (Tob), *P. duboscqi* (Dub). Accession numbers are indicated in the sequence name. Sequences without signal peptide were aligned with ClustalW and refined using Boxshade server, and the percentage of the identities or similarities that must agree for shading was set at 80%. Black background shading represents identical amino acids, and grey shading designates similar amino acids, while white shading indicates no similarity. (Ø) indicates changes in the prediction of the secondary structure between *P. perniciosus* Spanish and Italian strains as performed by Protean (DNASTAR, Lasergene). (↓) signs above amino acids indicate changes in phosphorylation sites as predicted by NetPhos 2.0 Server, and the amino acid affected by the prediction on the phosphorylation site is encircled.



FIGURE 6: Alignment of SP06 from *P. perniciosus* Italian strain (PerIta), *P. perniciosus* Spanish strain (PerSpa), and lufaxin from *L. longipalpis* (Lon). Accession numbers are indicated in the sequence name. Sequences without a signal peptide were aligned with ClustalW and refined using Boxshade server, and the percentage of the identities or similarities that must agree for shading was set at 80%. Black background shading represents identical amino acids, and grey shading designates similar amino acids, while white shading indicates no similarity. (Ø) indicates changes in the prediction of the secondary structure between *P. perniciosus* Spanish and Italian strains as performed by Protean (DNASTAR, Lasergene). (↓) signs above amino acids indicate changes in phosphorylation sites as predicted by NetPhos 2.0 Server, and the amino acid affected by the prediction on the phosphorylation site is encircled.

expression pattern was attained for these salivary proteins as the corresponding Coomassie blue-stained bands matched the theoretical Mw, and Western blot revealed the presence of His-tagged protein (Figure 7 and Figure 8(b), resp.).

The apyrase SP01B and the D7-related protein SP04 were chosen for expression and purification since they had previously described as antigens for mice, hamsters, and dogs [7, 17], and they are highly represented in the saliva as seen in *P. perniciosus* salivary proteome [17, 19]. Apyrases have been pointed as good vaccine candidates since they display putative MHC epitopes, and a recombinant apyrase of *P. ariasi* produced protective cellular DTH responses in mice

[27, 29, 48]. Besides, apyrases are conserved proteins among sand flies and therefore good candidates for a wider vaccine [29].

**3.3. Immunogenicity of Recombinant SP01B and SP04.** Both recombinant proteins SP01B and SP04 were recognized by the sera of hamsters and mice exposed to sand fly bites in Western blot (Figure 8(a)).

Therefore, immunogenicity of the recombinant proteins was conserved for at least these animals after expression in a prokaryote system. Thus, we hypothesize that part of their

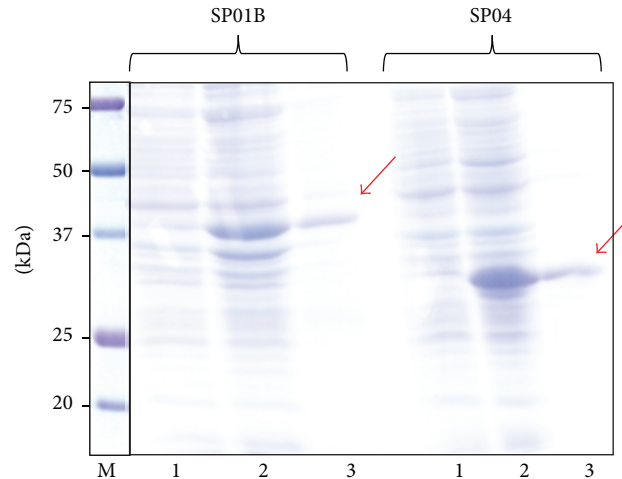


FIGURE 7: Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel illustrating the expression and purification of the recombinant salivary proteins SP01B and SP04. Precision Plus Dual Xtra Standard (BioRad) was used as a marker (M). Lanes 1 and 2 show the bacterial extract before and after protein-expression induction by the addition of IPTG. Lane 3 shows the purified recombinant proteins.

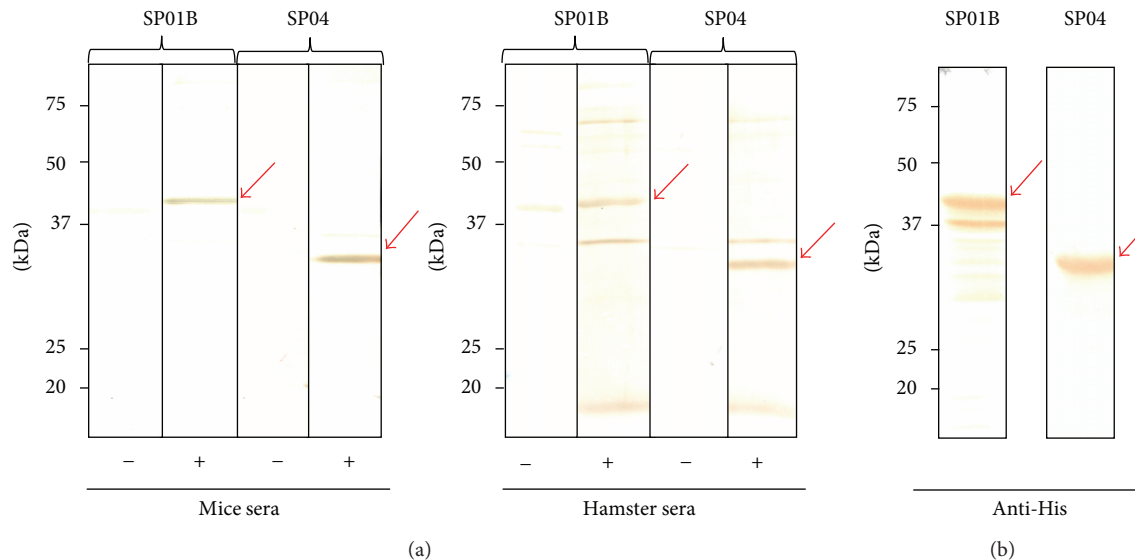


FIGURE 8: (a) Recognition of *P. perniciosus* recombinant salivary proteins SP01B and SP04 by Western blot using pooled sera of control and immunized mice and hamsters (marked as – and +, resp.). (b) Western blot with His antibodies confirmed the presence of the recombinant His-tagged proteins SP01B and SP04.

immunogenicity is due either to lineal epitopes or conformational ones after an appropriate refolding. Posttranslational modifications that may occur in nature might contribute to their immunogenicity but do not seem to be essential for the recognition of mice and hamster sera as the recombinant proteins lack them. Previously, we had found that SP01B was recognized by the sera of both hamsters and mice while SP04 was highlighted only by hamster sera [17]. However, in the current experiments, both recombinant proteins were recognized by hamster and mice sera. In the case of SP04, the discrepancy observed with previous results may be due to the differences in the schedule followed to immunize the mice (100 flies weekly over 10 weeks versus 13 times exposure to 150 flies). Moreover, the anti-saliva IgG levels from *P. perniciosus*

mice immunized 13 times to 150 times were much higher than those sera from the other set of mice (data not shown).

#### 4. Conclusions

Several polymorphisms were found between transcripts from the cDNA library of salivary glands of *P. perniciosus* and the cDNA library previously annotated [19], and further studies should be done in order to determine the biological meaning of all these polymorphisms. On the other hand, high level of conservancy was found between salivary transcripts of *P. perniciosus* from Spain and Italy thus, little antigenic variation is expected suggesting that recombinant salivary



proteins could be used in different geographic areas where this sand fly species is present. Moreover, we successfully cloned, expressed, and purified SP01B and SP04 salivary proteins of *P. perniciosus*. Further characterization of these recombinant proteins will give additional information about their function, especially for SP04, as the functionality of the D7-related proteins has not been experimentally confirmed in sand flies. In addition, we preliminarily tested the immunogenicity of these proteins with hyperimmune sera of mice and hamsters experimentally exposed to sand fly bites. Yet, these proteins should be further tested with sera of other reservoirs such as dogs, cats, hares, rabbits, and also with human sera in order to assess if they preserve immunogenicity for these species or not. In addition, further characterization of cellular immune responses of these recombinant proteins should be carried out to determine whether they could be selected as vaccine candidates against leishmaniasis.

Furthermore, to ensure that the best epidemiological markers are selected, it should be necessary to evaluate several recombinant proteins with sera of different hosts to select the most widely recognized proteins and test them alone or in combinations to cover a wide range of host immune responses. In this sense, additional works are in progress to obtain other recombinant proteins.

## Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

## Acknowledgments

This study was partially funded by the Spanish Ministry of Science & Innovation (Project AGL2008-01592) and by EU grant FP7-2011-261504 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext 082 (<http://www.edenext.eu/>). The contents of this paper are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. Inés Martín-Martín is a Ph. D. recipient of a fellowship from the Spanish Ministry of Science & Innovation (FPI-MICINN).

## References

- [1] WHO, *Control of the Leishmaniases*, Technical Report Series no. 949, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2010.
- [2] J. M. C. Ribeiro and I. M. B. Francischetti, "Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives," *Annual Review of Entomology*, vol. 48, pp. 73–88, 2003.
- [3] S. Kamhawi, "The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections," *Microbes and Infection*, vol. 2, no. 14, pp. 1765–1773, 2000.
- [4] A. Barral, E. Honda, A. Caldas et al., "Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker?" *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 62, no. 6, pp. 740–745, 2000.
- [5] R. Gomes and F. Oliveira, "The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity," *Frontiers in Immunology*, vol. 3, article 110, 2012.
- [6] I. Rohoušová and P. Volf, "Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission," *Folia Parasitologica*, vol. 53, no. 3, pp. 161–171, 2006.
- [7] M. Vlková, I. Rohoušová, J. Drahota et al., "Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 10, article e1344, 2011.
- [8] M. Vlková, I. Rohoušová, J. Hostomská et al., "Kinetics of antibody response in BALB/c and C57BL/6 mice bitten by *Phlebotomus papatasi*," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 7, article e1719, 2012.
- [9] K. Gidwani, A. Picado, S. Rijal et al., "Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: a cluster-randomized trial," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 9, article e1296, 2011.
- [10] C. Teixeira, R. Gomes, N. Collin et al., "Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 3, article e638, 2010.
- [11] A. P. Souza, B. B. Andrade, D. Aquino et al., "Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 3, article e649, 2010.
- [12] M. F. Clements, K. Gidwani, R. Kumar et al., "Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 82, no. 5, pp. 801–807, 2010.
- [13] J. G. Valenzuela, Y. Belkaid, E. Rowton, and J. M. C. Ribeiro, "The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases," *Journal of Experimental Biology*, vol. 204, no. 2, pp. 229–237, 2001.
- [14] S. Marzouki, M. Abdeladhim, C. B. Abdesslem et al., "Salivary antigen SP32 is the immunodominant target of the antibody response to *Phlebotomus papatasi* bites in humans," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 11, article e1911, 2012.
- [15] R. Molina, M. I. Jiménez, I. Cruz et al., "The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain," *Veterinary Parasitology*, vol. 190, no. 1–2, pp. 268–271, 2012.
- [16] M. Jiménez, E. González, A. Iriso et al., "Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain," *Parasitology Research*, vol. 112, no. 7, pp. 2453–2459, 2013.
- [17] I. Martín-Martín, R. Molina, and M. Jiménez, "An insight into the *Phlebotomus perniciosus* saliva by a proteomic approach," *Acta Tropica*, vol. 123, no. 1, pp. 22–30, 2012.
- [18] I. Martín-Martín, R. Molina, and M. Jiménez, "Identifying salivary antigens of *Phlebotomus argentipes* by a 2DE approach," *Acta Tropica*, vol. 126, no. 1, pp. 229–239, 2013.
- [19] J. M. Anderson, F. Oliveira, S. Kamhawi et al., "Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis," *BMC Genomics*, vol. 7, article 52, 2006.
- [20] R. Molina, "Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae)," *Research and Reviews in Parasitology*, vol. 51, no. 1–4, pp. 87–89, 1991.
- [21] J. Sambrook and D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA, 2001.

- [22] R. Gupta, E. Jung, and S. Brunak, "Prediction of N-glycosylation sites in human proteins," in preparation, 2004, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.
- [23] K. Julenius, A. Mølgaard, R. Gupta, and S. Brunak, "Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites," *Glycobiology*, vol. 15, no. 2, pp. 153–164, 2005.
- [24] N. Blom, S. Gammeltoft, and S. Brunak, "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites," *Journal of Molecular Biology*, vol. 294, no. 5, pp. 1351–1362, 1999.
- [25] G. C. Lanzaro, A. H. C. S. Lopes, J. M. C. Ribeiro et al., "Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex," *Insect Molecular Biology*, vol. 8, no. 2, pp. 267–275, 1999.
- [26] R. S. Milleron, J.-P. Mutebi, S. Valle et al., "Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 70, no. 3, pp. 286–293, 2004.
- [27] H. Kato, J. M. Anderson, S. Kamhawi et al., "High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya)," *BMC Genomics*, vol. 7, article 226, 2006.
- [28] M. Abdeladhim, R. C. Jochim, M. Ben Ahmed et al., "Updating the salivary gland transcriptome of *Phlebotomus papatasi* (Tunisian Strain): the search for sand fly-secreted immunogenic proteins for humans," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, Article ID e47347, 2012.
- [29] S. S. Mahamdallie and P. D. Ready, "No recent adaptive selection on the apyrase of Mediterranean *Phlebotomus*: implications for using salivary peptides to vaccinate against canine leishmaniasis," *Evolutionary Applications*, vol. 5, no. 3, pp. 293–305, 2012.
- [30] D.-E. A. Elnalem, C. Meneses, M. Slotman, and G. C. Lanzaro, "Genetic variation in the sand fly salivary protein, SP-15, a potential vaccine candidate against *Leishmania major*," *Insect Molecular Biology*, vol. 14, no. 2, pp. 145–150, 2005.
- [31] A. Oleaga, A. Escudero-Población, E. Camafeita, and R. Pérez-Sánchez, "A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 37, no. 11, pp. 1149–1159, 2007.
- [32] I. M. B. Francischetti, V. M. Pham, B. J. Mans et al., "The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae)," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 35, no. 10, pp. 1142–1161, 2005.
- [33] L. Patthy, "Alternative splicing: evolution," *eLS*, 2008.
- [34] C. Walsh, M. Gangloff, T. Monie et al., "Elucidation of the MD-2/TLR4 interface required for signaling by lipid IVa," *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 2, pp. 1245–1254, 2008.
- [35] J. M. C. Ribeiro, B. J. Mans, and B. Arcà, "An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 40, no. 11, pp. 767–784, 2010.
- [36] J. G. Valenzuela, R. Charlab, E. C. Gonzalez et al., "The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera," *Insect Molecular Biology*, vol. 11, no. 2, pp. 149–155, 2002.
- [37] A. A. James, K. Blackmer, O. Marinotti, C. R. Ghosn, and J. V. Racioppi, "Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 44, no. 2, pp. 245–254, 1991.
- [38] B. Arcà, F. Lombardo, A. Lanfrancotti et al., "A cluster of four D7-related genes is expressed in the salivary glands of the African malaria vector *Anopheles gambiae*," *Insect Molecular Biology*, vol. 11, no. 1, pp. 47–55, 2002.
- [39] R. Charlab, J. G. Valenzuela, E. D. Rowton, and J. M. C. Ribeiro, "Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 26, pp. 15155–15160, 1999.
- [40] E. Calvo, B. J. Mans, J. F. Andersen, and J. M. C. Ribeiro, "Function and evolution of a mosquito salivary protein family," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 4, pp. 1935–1942, 2006.
- [41] I. Rohoušová, S. Subrahmanyam, V. Volfová et al., "Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 5, article e1660, 2012.
- [42] P. H. Alvarenga, I. M. B. Francischetti, E. Calvo, A. Sá-Nunes, J. M. C. Ribeiro, and J. F. Andersen, "The function and three-dimensional structure of a thromboxane A2/cysteinyl leukotriene-binding protein from the saliva of a mosquito vector of the malaria parasite," *PLoS Biology*, vol. 8, no. 11, Article ID e1000547, 2010.
- [43] E. Calvo, B. J. Mans, J. M. C. Ribeiro, and J. F. Andersen, "Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 10, pp. 3728–3733, 2009.
- [44] J. Hostomská, V. Volfová, J. Mu et al., "Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*," *BMC Genomics*, vol. 10, article 282, 2009.
- [45] J. G. Valenzuela, Y. Belkaid, M. K. Garfield et al., "Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 194, no. 3, pp. 331–342, 2001.
- [46] P. K. Geyer, C. Spana, and V. G. Corces, "On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the yellow locus of *Drosophila melanogaster*," *EMBO Journal*, vol. 5, no. 10, pp. 2657–2662, 1986.
- [47] X. Xu, F. Oliveira, B. W. Chang et al., "Structure and function of a "yellow" protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 37, pp. 32383–32393, 2011.
- [48] F. Oliveira, S. Kamhawi, A. E. Seitz et al., "From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library," *Vaccine*, vol. 24, no. 3, pp. 374–390, 2006.
- [49] N. Collin, T. C. Assumpcao, D. M. Mizurini et al., "Lufaxin, a novel factor Xa inhibitor from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* blocks protease-activated receptor 2 activation and inhibits inflammation and thrombosis in vivo," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 32, no. 9, pp. 2185–2198, 2012.
- [50] T. R. de Moura, F. Oliveira, M. W. Carneiro et al., "Functional transcriptomics of wild-caught *Lutzomyia intermedia* salivary glands: identification of a protective salivary protein against *Leishmania braziliensis* infection," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 5, article e2242, 2013.

- [51] H. Kato, R. C. Jochim, E. A. Gomez et al., “Analysis of salivary gland transcripts of the sand fly *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis,” *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 13, pp. 56–66, 2012.
- [52] J. Dai, J. Liu, Y. Deng, T. M. Smith, and M. Lu, “Structure and protein design of a human platelet function inhibitor,” *Cell*, vol. 116, no. 5, pp. 649–659, 2004.



# The Scientific World Journal

Hindawi Publishing Corporation  
<http://www.hindawi.com>

Volume 2013



Hindawi

- ▶ Impact Factor **1.730**
- ▶ **28 Days** Fast Track Peer Review
- ▶ All Subject Areas of Science
- ▶ Submit at <http://www.tswj.com>





# Recombinant Antigens from *Phlebotomus perniciosus* Saliva as Markers of Canine Exposure to Visceral Leishmaniasis Vector

Jan Drahota<sup>1\*</sup>, Ines Martin-Martin<sup>2,3</sup>, Petra Sumova<sup>1</sup>, Iva Rohousova<sup>1</sup>, Maribel Jimenez<sup>2</sup>, Ricardo Molina<sup>2</sup>, Petr Volf<sup>1</sup>

**1** Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, **2** Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

## Abstract

**Background:** *Phlebotomus perniciosus* is the main vector in the western Mediterranean area of the protozoan parasite *Leishmania infantum*, the causative agent of canine and human visceral leishmaniasis. Infected dogs serve as a reservoir of the disease, and therefore measuring the exposure of dogs to sand fly bites is important for estimating the risk of *L. infantum* transmission. In bitten hosts, sand fly saliva elicits a specific antibody response that reflects the intensity of sand fly exposure. As screening of specific anti-saliva antibodies is limited by the availability of salivary gland homogenates, utilization of recombinant salivary proteins is a promising alternative. In this manuscript we show for the first time the use of recombinant salivary proteins as a functional tool for detecting *P. perniciosus* bites in dogs.

**Methodology/Principal Findings:** The reactivity of six bacterially-expressed recombinant salivary proteins of *P. perniciosus*, yellow-related protein rSP03B, apyrases rSP01B and rSP01, antigen 5-related rSP07, ParSP25-like protein rSP08 and D7-related protein rSP04, were tested with sera of mice and dogs experimentally bitten by this sand fly using immunoblots and ELISA. In the immunoblots, both mice and canine sera gave positive reactions with yellow-related protein, both apyrases and ParSP25-like protein. A similar reaction for recombinant salivary proteins was observed by ELISA, with the reactivity of yellow-related protein and apyrases significantly correlated with the antibody response of mice and dogs against the whole salivary gland homogenate.

**Conclusions/Significance:** Three recombinant salivary antigens of *P. perniciosus*, yellow-related protein rSP03B and the apyrases rSP01B and rSP01, were identified as the best candidates for evaluating the exposure of mice and dogs to *P. perniciosus* bites. Utilization of these proteins, or their combination, would be beneficial for screening canine sera in endemic areas of visceral leishmaniasis for vector exposure and for estimating the risk of *L. infantum* transmission in dogs.

**Citation:** Drahota J, Martin-Martin I, Sumova P, Rohousova I, Jimenez M, et al. (2014) Recombinant Antigens from *Phlebotomus perniciosus* Saliva as Markers of Canine Exposure to Visceral Leishmaniasis Vector. PLoS Negl Trop Dis 8(1): e2597. doi:10.1371/journal.pntd.0002597

**Editor:** Shaden Kamhawi, National Institutes of Health, United States of America

**Received:** June 20, 2013; **Accepted:** November 4, 2013; **Published:** January 2, 2014

**Copyright:** © 2014 Drahota et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This research was supported by Czech Science Foundation (GACR 13-05292S, <http://www.gacr.cz/>) and by EU grant 2011-261504 EDENEXT (<http://www.edenext.eu/>) and the paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENextXXX. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: jandrahota@seznam.cz

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Canine leishmaniasis (CanL) is a systemic disease with variable clinical symptoms. Its causative agent, the protozoan parasite *Leishmania infantum*, is transmitted by phlebotomine sand flies (Diptera: *Phlebotominae*). CanL occurs frequently around the Mediterranean Basin and in many countries in Latin America, where the prevalence of infection often exceeds 25%. Dogs with inapparent infections often play a role in the circulation of the parasite, as they are able to infect sand flies (reviewed in [1]). New cases of autochthonous leishmaniasis caused by *L. infantum* have been occurring in various countries, suggesting an expansion of CanL towards new biotopes at higher latitudes and higher altitudes (reviewed in [2,3,4]). Importantly, CanL is not just a

veterinary problem; infected dogs serve as a reservoir host of human visceral leishmaniasis and there is a correlation between the prevalence of leishmaniasis in the canine population and the human disease in many countries [1].

Two sand fly genera are involved in *L. infantum* transmission, *Lutzomyia* in the New World and *Phlebotomus* in the Old World. Seven species of the genus *Phlebotomus*, subgenus *Larroussius*, are proven or probable vectors of CanL in different places around the Mediterranean Basin [5]. Of these, *Phlebotomus perniciosus* has the widest distribution, with ranges in both the southern and northern parts of the Mediterranean, from Morocco and Portugal in the west to Italy in the east and Germany in the north [5].

Measuring the exposure of dogs to sand fly bites is important for estimating the risk of *L. infantum* transmission. Recently, it has been

## Author Summary

The protozoan parasite *Leishmania infantum* is a causative agent of zoonotic visceral leishmaniasis, an important and potentially fatal human disease. The main reservoir hosts of this *Leishmania* species are dogs, and the only proven vectors are phlebotominae sand flies, *Phlebotomus perniciosus* being considered the major vector in the western Mediterranean area. During feeding on the host, sand flies spit saliva into the host skin; hosts develop a specific antibody response directed against sand fly salivary proteins and levels of these antibodies reflect the intensity of sand fly exposure. As the availability of salivary gland homogenate is limited, recombinant salivary proteins have been suggested as antigens suitable for measuring specific antibody levels. In the present work, we expressed six of the most-antigenic salivary proteins, and studied the mice and canine humoral immune responses to these recombinant proteins. We demonstrated that three proteins, a yellow-related protein and two apyrases, are suitable antigens for measuring anti-*P. perniciosus* antibody levels and estimating the host exposure to this sand fly species.

demonstrated that experimental exposure of dogs to *L. longipalpis* or *P. perniciosus* bites elicits the production of specific anti-saliva IgG (measured by ELISA with whole SGH) that positively correlates with the number of sand fly bites [6,7]. The elicitation of IgG antibody levels persists for at least five weeks after last exposure of dogs to *P. perniciosus* [7] or even nineteen weeks after dogs are exposed to *L. longipalpis* [6]. Therefore, monitoring canine IgG levels specific for sand fly saliva could indicate their exposure to sand fly bites. Such a monitoring technique would be useful for evaluating the need for, and effectiveness of, anti-vector campaigns [6,8]. However, obtaining sufficient native antigens through sand fly dissections for the upscaled production of such antigens necessary for ELISA is not feasible; thus there is a need to replace native antigens in the ELISAs by recombinant antigens. To date, recombinant salivary proteins from *Phlebotomus papatasi* have been used to detect the antibody response in mice experimentally exposed to this sand fly species [9], and *L. longipalpis* recombinant antigens have been tested for reactivity with the sera of naturally bitten humans, dogs and foxes [10,11].

Recent studies [7,12] have shown that the sera of dogs bitten by *P. perniciosus* recognize up to thirteen antigens in the salivary gland homogenate (SGH) of this species. The most intense reaction has repeatedly been observed against the 43 kDa yellow-related protein PpeSP03B (referred to further in the text as yellow protein rSP03B), the 35.3 kDa PpeSP01B and 35.5 kDa PpeSP01 kDa apyrases (apyrase rSP01B and rSP01, respectively), the 30 kDa antigen 5-related protein PpeSP07 (antigen 5 rSP07), the 29 kDa ParSP25-like protein PpeSP08 (ParSP25 protein rSP08), and the 24.5 kDa D7-related salivary protein PpeSP04 (D7 protein rSP04). The recombinant forms of these six proteins were therefore chosen in the present work as the most promising candidates for markers of *P. perniciosus* exposure.

## Materials and Methods

### 1. Ethics statement

SKH1-hr mice were maintained and handled in the animal facility of Charles University in Prague in accordance with institutional guidelines and Czech legislation (Act No. 246/1992 coll. on Protection of Animals against Cruelty in present statutes at large), which complies with all relevant European Union and

international guidelines for experimental animals. The experiments were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Charles University in Prague (Permit Number: 24773/2008-10001) and were performed under the Certificate of Competency (Registration Number: CZU 934/05; CZU 307/09) in accordance with the Examination Order approved by Central Commission for Animal Welfare of the Czech Republic.

### 2. Sand flies and salivary gland homogenate

Two *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* sand fly colonies originating from Spain – from Murcia and from Madrid – were used, and maintained under standard conditions described in [13,14].

*Phlebotomus perniciosus* salivary glands for immunoblots and ELISA assays were dissected from 3 to 5-day-old females, and pools of 20 salivary glands in 20 µl of Tris-NaCl buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Salivary gland homogenate (SGH) was obtained by disruption of the glands with repeated freezing and thawing cycles. Salivary glands used for isolation of mRNA were dissected from 1-day-old female sand flies, and were stored in groups of 20 salivary glands in 20 µl of RNAlater (Qiagen) and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

### 3. Mice and canine sera

Hyperimmune mice sera were obtained by repeated exposure of three SKH1hr mice to bites of uninfected *P. perniciosus* females; three other mice of the same strain served as non-exposed controls. Canine sera from dogs (beagles) experimentally exposed to *P. perniciosus* bites were selected from those previously used for studies on SGH [7]. Sera were chosen to cover a wide range of anti-saliva antibody levels: six originated from highly exposed dogs (bitten by 150–190 sand fly females once a week), six from dogs with lower exposure (20–70 females once a week) and six from unexposed dogs (before exposure). The sera of exposed dogs were collected seven days after the fourth exposure.

### 4. Recombinant salivary proteins

Six bacterially-expressed recombinant antigens expressed in nine forms were studied: yellow protein rSP03B (KF257369), two apyrases - rSP01B (KF257364, KF257366, KF178455) and rSP01 (KF257365, KF257367), antigen 5 protein rSP07 (KF257368), ParSP25 protein rSP08 (KF178457) and D7 protein rSP04 (KF178456). Coding sequences of SP01 and SP01B (referred to further in the text as rSP01B/1 in pET42b and rSP01/1 in pET42b, respectively), SP07 and SP03B were obtained from salivary glands of *P. perniciosus* (Murcia colony). After dissection into RNAlater, mRNA was isolated by a Roche High Pure RNA Tissue Kit and transcribed to cDNA by a Roche High Fidelity cDNA Synthesis Kit using polyA primers. The second cDNA strands of SP01B and SP01 were amplified by PCR using specific primers that were synthesized according to the sequences of the mature protein (without signal peptide). These sequences have been published with the following accession numbers [15]: rSP01B/1 - DQ192491 and SP01/1 - DQ192490. Afterwards, we followed the procedure that was described in [9] – briefly, genes were expressed in pET42b (Novagen) with a His tag containing 8 histidines – the *E. coli* BL21 (DE3) expression system. In parallel, single-stranded cDNA transcribed from salivary glands as described above was sent to Apronex s.r.o. (Prague) for preparation of rSP01, rSP01B, rSP03B and rSP07 proteins in the recombinant form according to sequences published in the cDNA library [15] - rSP03B (DQ150622), rSP01B/2 (DQ192491), rSP01/2 (DQ192490), rSP07 (DQ153101). All four proteins were expressed in the *E. coli* BL21 (DE3) expression system; apyrases rSP01B/2 and rSP01/2 were expressed in the pET42b vector

(Novagen) with 2 His tags - the first containing 6 histidines and the second 8 histidines, and a 1.4 kDa adaptor, while yellow protein rSP03B and antigen 5 protein rSP07 were expressed in the pET28b vector (Novagen) with 1 His tag containing 6 histidines. All proteins were isolated under denaturing conditions with 8M urea.

In addition, salivary coding sequences of SP01B, SP04 and SP08 were obtained from a cDNA library constructed from the salivary glands of *P. perniciosus* from Madrid – GenBank accession numbers are: SP01B - HE974345.1, SP04 - HE980444.1, SP08 - HE974347.1; in contrast to the other proteins tested, they contain signal sequences (thus they seem to be about 3 kDa heavier on immunoblots). Recombinant proteins rSP01B and rSP04 were expressed in the pQE31 vector (Qiagen) with a His tag containing 6 histidines in *E. coli* M15 cells, and purified under denaturing conditions with 8M urea. Protein rSP08 was cloned into the pGEX4T3 vector (Amersham Biotech), expressed in *E. coli* Arctic Express cells (Agilent), and purified by polyacrylamide gel extraction in PBS. As rSP08 was expressed as a fusion protein with glutathione S-transferase (GST), the latter was also obtained and used as a control in immunoblots and ELISA. In all these cases, protein refolding was performed using dialysis against PBS using SnakeSkin Dialysis Tubing (10 kDa MWCO, Thermo Scientific Goettgen, Germany).

The concentration of all proteins was quantified by the Lowry method (Bio-Rad) following the manufacturer's protocol.

## 5. Immunoblots

The immunogenicity of the recombinant proteins was tested by the immunoblot technique. Recombinant salivary proteins were separated by SDS PAGE on 12% polyacrylamide gels under non-reducing conditions using a Mini-protein apparatus (Bio-Rad). Protein concentration was optimized using preliminary experiments; the list of proteins and their quantity per well of the 5-well comb are given in Table 1. Proteins were either stained with Coomassie Blue (Invitrogen) or transferred from the gel to nitrocellulose membranes using an iBLOT dry system (Invitrogen).

Membranes were cut into strips (area corresponding to one well was cut into 5 strips), blocked for 1–2 hours with 5% milk in Tris buffer with 0.05% Tween (Tris-Tw) and then incubated for 1 hour with either mice or canine sera diluted in Tris-Tw. Mice sera were diluted 1:200 for denatured proteins rSP01B and rSP01 in pET42b and 1:100 in the case of other proteins; canine sera were used at a dilution of 1:50. After washing in Tris-Tw, the strips were incubated with peroxidase conjugated anti-mouse IgG (1:1000, AbD Serotec) or anti-dog IgG antibodies (1:1000, Bethyl) and

reacting protein bands were visualized using the substrate solution with diaminobenzidine.

## 6. ELISA

The ELISA test described elsewhere [7,16] was modified as follows. Covalink plates (Nunc) were coated with 100 µl of either salivary gland homogenate (40 ng of protein per well, corresponds to 1/5 of a salivary gland) or recombinant salivary protein, both in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5), overnight at 4°C. The optimal concentrations of the recombinant proteins are given in Table 1. After washing in PBS with 0.05% Tween (PBS-Tw), plates were blocked with 6% milk in PBS-Tw for 1–2 h at 37°C.

Mice and canine sera were diluted in 2% milk PBS-Tw. Dilution of mice sera 1:1600 was optimal for rSP03B, 1:400 for apyrases in pET42b with 1 His tag, and 1:200 for the other proteins tested. All canine sera were used at a dilution of 1:50. Sera were incubated for 90 min at 37°C. Following washing cycles, plates were incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (AbD Serotec) or anti-dog IgG (Bethyl) and the color reaction was developed in the substrate solution with orthophenyldiamine. Absorbance values (OD) were recorded at 492 nm using a Multiscan RC ELISA reader (Labsystems).

## 7. Statistical analysis

The non-parametric Spearman test was used to assess correlations between total anti-SGH and anti-recombinants antibody levels in GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Statistical significance was considered when the p-value was <0.05.

## 8. Accession numbers

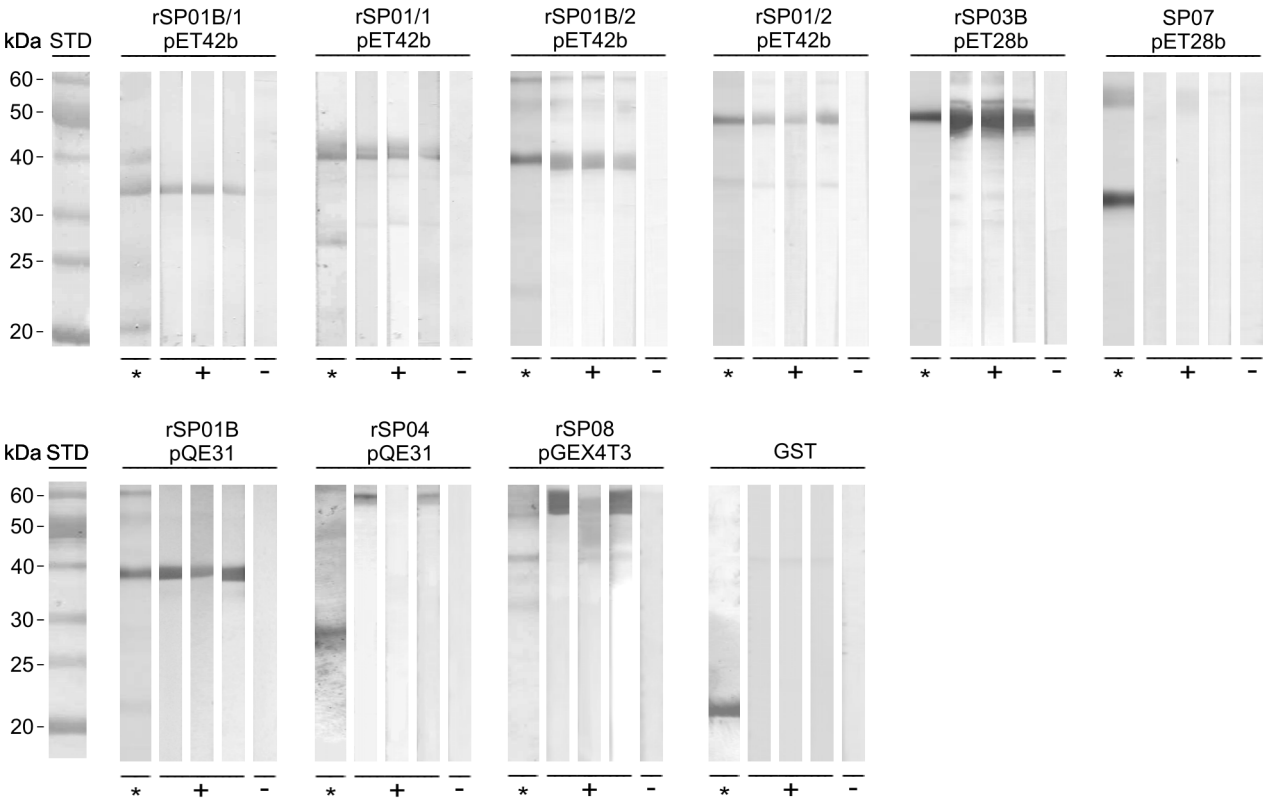
The sequences of apyrases rSP01B/1 (in pET42b), rSP01B/2 (in pET42b), rSP01/1 (in pET42b) and rSP01/2 (in pET42b), yellow protein rSP03B (in pET28b) and antigen 5 protein rSP07 (in pET28b) were based on sequences from a published cDNA library of *P. perniciosus* [15]: rSP01B - DQ192491, rSP01 - DQ192490, rSP03B - DQ150622 and rSP07 - DQ153101. The other sequences were published directly in GenBank: rSP01B (in pQE31) - HE974345.1, rSP04 (in pQE31) - HE980444.1, rSP08 (pGEX4T3) - HE974347.1. The expressed sequences were published with the following GenBank accession numbers: yellow protein rSP03B (KF257369), two apyrases - rSP01B (KF257364, KF257366, KF178455) and rSP01 (KF257365, KF257367), antigen 5 protein rSP07 (KF257368), ParSP25 protein rSP08 (KF178457) and D7 protein rSP04 (KF178456).

**Table 1.** Concentrations of recombinant proteins used for immunoblots (µg per well) and ELISA (µg/ml) with mice and canine sera.

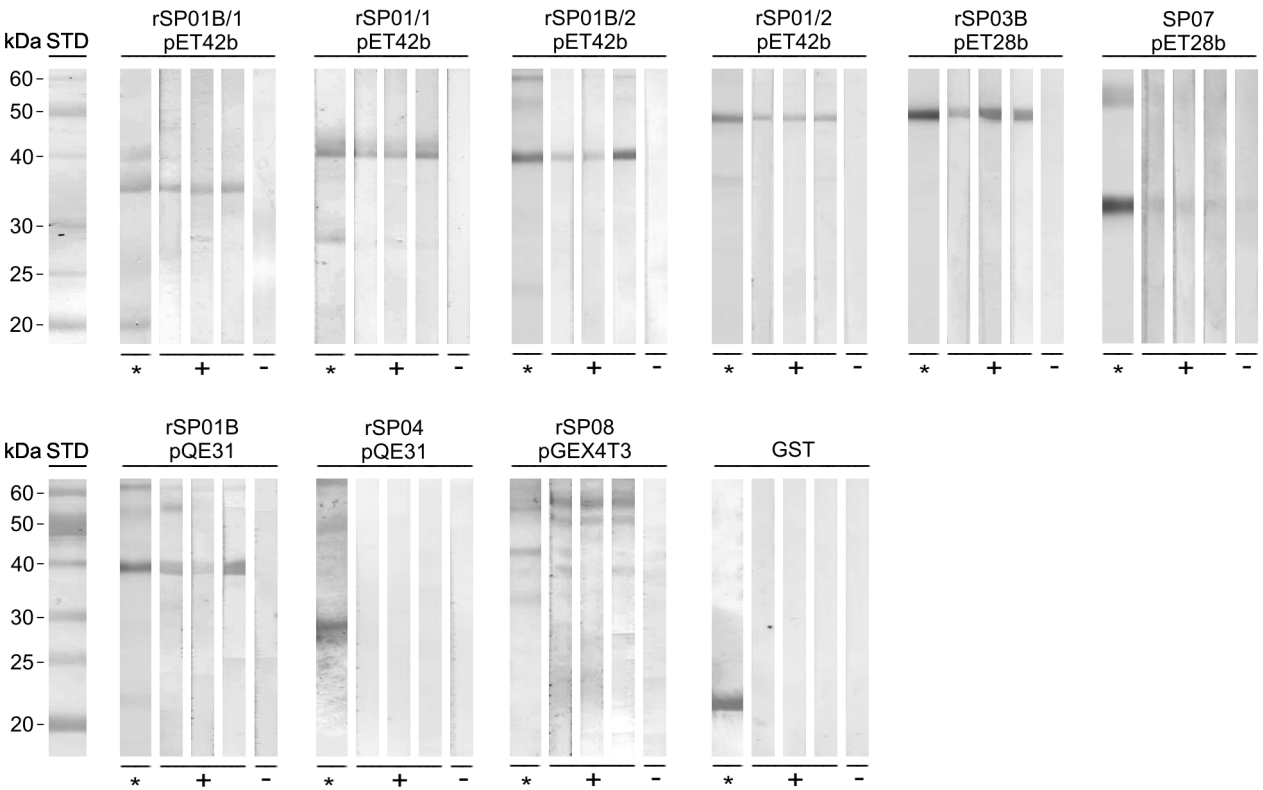
	Protein	Immunoblot	ELISA mouse	ELISA dog
Denatured	Apyrase rSP01B/1 pET42b	3	6	9
	Apyrase rSP01/1 pET42b	4	6	6
	Apyrase rSP01B/2 pET42b	9	6	9
	Apyrase rSP01/2 pET42b	6	3	3
	Yellow protein rSP03B pET28b	4	3	3
	Antigen 5-related protein rSP07 pET28b	9	9	9
Refolded	Apyrase rSP01B pQE31	9	35	35
	D7-related protein rSP04 pQE31	9	18	18
	ParSP25-like protein rSP08 pGEX4T3	13	3	13

doi:10.1371/journal.pntd.0002597.t001

A. Mice sera



B. Canine sera



**Figure 1. Reactivity of recombinant *P. perniciosus* salivary proteins with mice and canine sera using immunoblots.** Six recombinant proteins from *P. perniciosus* saliva - yellow protein rSP03B, apyrases rSP01B and rSP01, antigen 5 protein rSP07, ParSP25 protein rSP08 and D7 protein rSP04, expressed in different vectors (pET28b, pET42b, pQE31, pGEX4T3) and a GST tag were tested. Apyrases in pET42b are expressed with either 1 His tag (rSP01/1 and rSP01B/1) or 2 His tags (rSP01/2 and rSP01B/2). Proteins were separated by SDS-PAGE and stained by Coomassie Blue (\*) or incubated with mice and canine sera. (A) Reaction with sera from three SKH1-hr mice experimentally bitten by *P. perniciosus* females (+) and one non-exposed mouse (-). (B) Reaction with sera from three beagles experimentally bitten by *P. perniciosus* (+) and pre-immune serum (-). doi:10.1371/journal.pntd.0002597.g001

## Results

### 1. Immunoblots with mice and canine sera

All recombinant proteins except antigen 5 protein rSP07 and D7 protein rSP04 were recognized by the sera of all three repeatedly exposed mice; control sera and the GST tag were negative (Fig. 1A). A similar reactivity of recombinant antigens was found with the sera of the three dogs repeatedly exposed to *P. perniciosus* (Fig. 1B); all recombinant proteins except antigen 5 protein rSP07 and D7 protein rSP04 were recognized by the sera of repeatedly exposed dogs. In comparison with mice sera, the reaction of canine sera was less intense for some proteins (yellow protein rSP03B and the apyrases rSP01B/2 and rSP01/2 in pET42b) and fewer nonspecific bands appeared in the immunoblots. Control canine sera were negative (Fig. 1B).

### 2. ELISA with mice sera

The sera of three bitten and three non-bitten mice were tested by ELISA for the presence of antibodies against the recombinant salivary proteins as well as for the anti-SGH antibodies. Results are summarized in Fig. 2. Bitten mice had a highly elevated antibody response to the following seven recombinant proteins: apyrase rSP01B in all three plasmids, both rSP01 apyrases, yellow protein rSP03B and ParSP25-like protein rSP08. Despite the low number of sera samples tested, five of these seven proteins also showed significant positive correlations with the antibody response to total SGH (rSP01B/1 in pET42b:  $r = 0.94$ ,  $p = 0.017$ ; rSP01B in pQE31:  $r = 0.94$ ,  $p = 0.017$ ; rSP01/1 in pET42b:  $r = 0.9$ ,  $p = 0.033$ ; rSP03B:  $r = 0.93$ ,  $p = 0.017$ ; rSP08:  $r = 1.0$ ,  $p = 0.003$ ).

The sixth and seventh proteins - rSP01B/2 and rSP01/2 in pET42b - showed positive correlations but were not significant ( $r = 0.77$ ,  $p = 0.103$  for both of them).

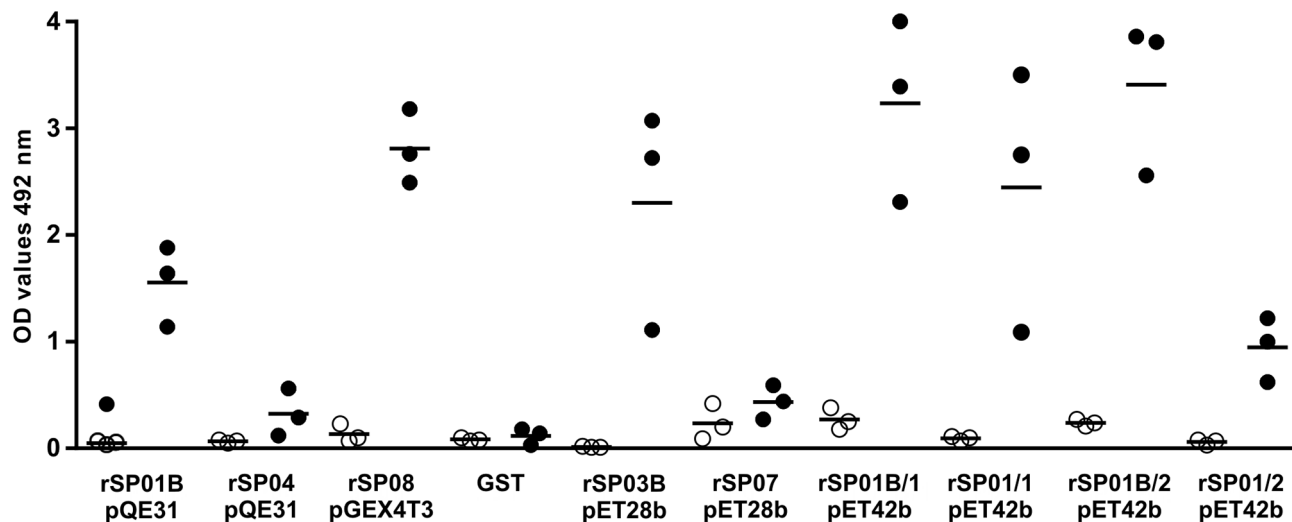
### 3. ELISA with canine sera

The ELISA results of recombinant proteins with eighteen canine sera (covering a wide range of anti-SGH antibody levels) are given in Fig. 3. Highly positive correlations with the reaction against SGH were obtained for the two denatured apyrases rSP01B and rSP01 (for both proteins in pET42b with 1 His tag:  $r = 0.91$ ,  $p < 0.0001$ ; for rSP01B with 2 His tags  $r = 0.89$ ,  $p < 0.0001$ ; and for rSP01 with 2 His tags  $r = 0.91$ ,  $p < 0.0001$ ) and yellow-related protein rSP03B ( $r = 0.89$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3). The correlations were not significant for the other four proteins tested (Fig. 3, data not shown for antigen 5 rSP07).

## Discussion

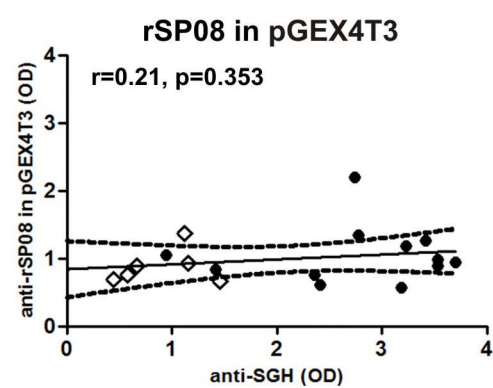
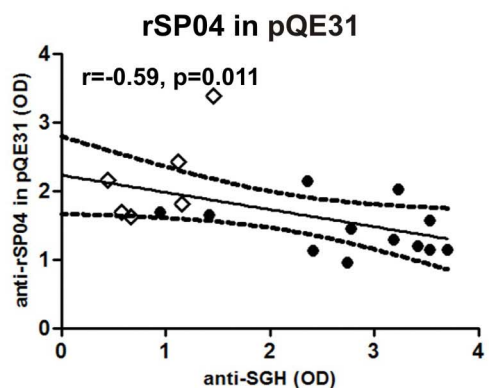
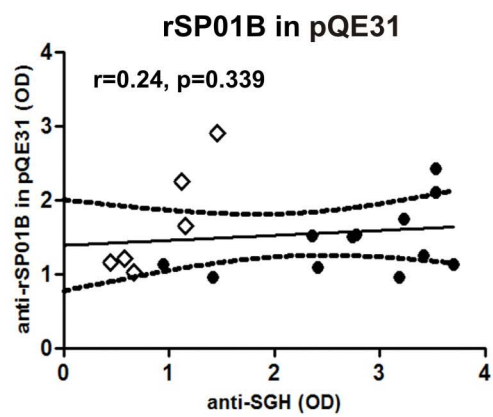
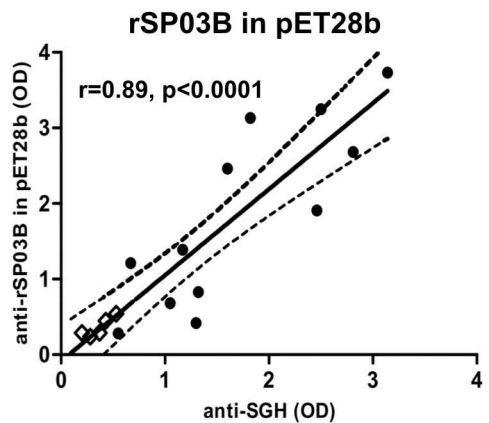
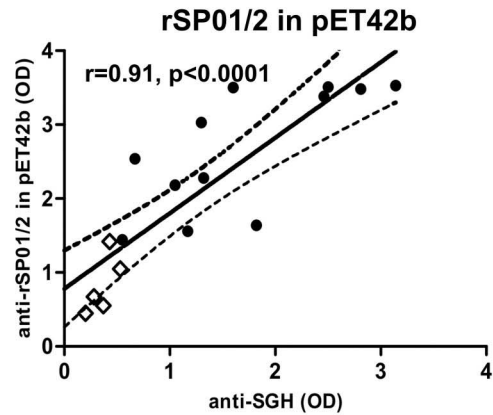
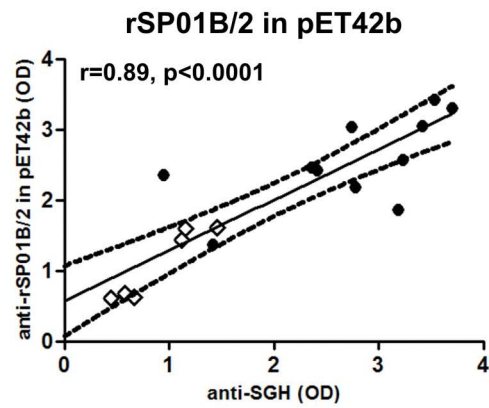
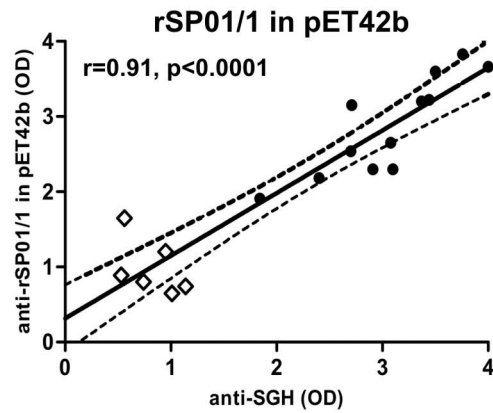
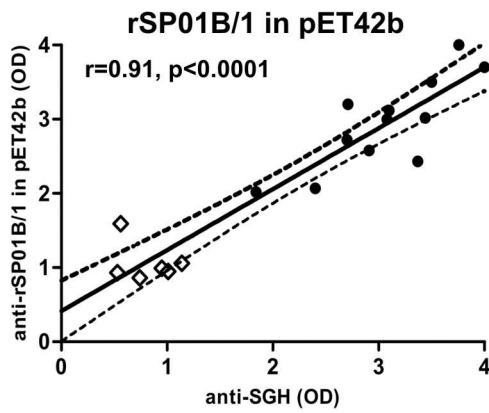
In this study, we evaluated the reactivity of six recombinant salivary proteins of *P. perniciosus* with animal sera using immunoblots and ELISA. We chose the sera of mice as model laboratory animals and the sera of dogs as the natural reservoir host of *L. infantum*.

In immunoblots, the recombinant antigens reacted similarly with both mice and canine sera: specific reactions were achieved with both apyrases rSP01B and rSP01 (altogether 5 forms tested), yellow protein rSP03B and ParSP25 protein rSP08. On the other hand, antigen 5 protein rSP07 and D7 protein rSP04 were not recognized by any sera. The only difference between mice and



**Figure 2. ELISA reactivity of recombinant *P. perniciosus* salivary proteins with mice sera.** Six recombinant proteins from *P. perniciosus* saliva - yellow protein rSP03B, apyrases rSP01B and rSP01, antigen 5 protein rSP07, ParSP25 protein rSP08 and D7 protein rSP04, expressed in different vectors (pET28b, pET42b, pQE31, pGEX4T3) and GST tag were tested. Apyrases in pET42b are expressed with either 1 His tag (rSP01/1 and rSP01B/1) or 2 His tags (rSP01/2 and rSP01B/2). Proteins were incubated with sera with sera from three SKH1 mice experimentally bitten by *P. perniciosus* females (black circles). Non-exposed sera of three SKH1-hr mice were used as controls (white circles). Bars show means of optical density values of all three exposed and non-exposed sera. OD=optical density. doi:10.1371/journal.pntd.0002597.g002





**Figure 3. ELISA reactivity of recombinant *P. perniciosus* salivary proteins with canine sera.** Six recombinant proteins from *P. perniciosus* saliva - yellow protein rSP03B, apyrases rSP01B and rSP01, antigen 5 protein rSP07, ParSP25 protein rSP08 and D7 protein rSP04, expressed in different vectors (pET28b, pET42b, pQE31, pGEX4T3) and GST tag were tested. Apyrases in pET42b are expressed with either 1 His tag (rSP01/1 and rSP01B/1) or 2 His tags (rSP01/2 and rSP01B/2). Proteins were incubated with sera from twelve beagles experimentally bitten by *P. perniciosus* females (black circles). Pre-immune sera of six beagles were used as the controls (white circles). Correlations between the levels of anti-SGH IgG and the levels of anti-recombinant proteins IgG were performed using a Spearman non-parametric test. OD=optical density, r=correlation index, p=p-value. doi:10.1371/journal.pntd.0002597.g003

canine sera was in the intensity of the positive bands – reactions with mice sera were stronger.

In ELISA, the reactivity of mice and canine sera differed in some aspects; the antibody response to refolded apyrase rSP01B, D7 protein rSP04 and ParSP25 protein rSP08 correlated with anti-SGH response only in mice sera. On the other hand, three denatured recombinant proteins, yellow protein rSP03B and two apyrases, rSP01B and rSP01, correlated significantly with the anti-SGH antibody response using both mice and canine sera. Variations in antigen conformation (denatured vs. refolded) may have led to the exposure of different epitopes. The discrepancy between results found for the refolded rSP01B and rSP08 using ELISA vs. immunoblot could be explained by differences in the exposure of antigens in these techniques; a similar lack of concordance has already been observed between ELISA and immunoblots with mice antibodies against *Phlebotomus sergenti* saliva [17].

Yellow-related proteins were found in the saliva of all sand fly species studied [18,19,20,21]. They were shown to have hemagglutination and lectin-like properties [22]. They also act as high affinity binders of proinflammatory biogenic amines such as serotonin, catecholamines and histamine, suggesting that these proteins may reduce inflammation during sand fly blood-feeding [23]. In *L. longipalpis*, yellow-related protein IJM11 has been proven to have immunogenic properties leading to protective cellular immunity in C57BL/6 mice against leishmaniasis caused by *L. major* [23,24]. Recombinant yellow-related proteins from *P. papatasi* and *L. longipalpis* reacted with the sera of hosts bitten by these sand flies [9,10,11]. Similarly, we have shown here that anti-*P. perniciosus* antibodies also strongly recognize recombinant yellow-related protein from *P. perniciosus* (Figures 1–3). Thus, yellow-related proteins appear to be, in general, promising markers of sand fly exposure.

Apyrases are nucleoside triphosphate-diphosphohydrolases ubiquitously present in the saliva of blood-sucking arthropods. They hydrolyze ADP and ATP in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner and inhibit ADP-induced platelet aggregation and inflammation to facilitate the blood feeding [18]. In sand fly host models, mouse and hamster antibodies elicited by *P. duboscqi* or *P. perniciosus* saliva recognized bacterially expressed apyrases of *P. duboscqi* and *P. perniciosus*, respectively [25,26].

The three recombinant salivary proteins from *P. perniciosus* are primarily designed for measuring the canine exposure to bites of

this sand fly in endemic areas of visceral leishmaniasis, and for estimating the risk of *L. infantum* transmission to dogs. Seven sand fly species belonging to the subgenus *Larrousius* are proven or probable vectors of *L. infantum* in the Mediterranean area, with five of them being the most important: *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus* and *P. tobbi* [5,27]. Among them, *P. perniciosus* is the most abundant in the Western Mediterranean at lower altitudes - in Italy, France, Spain and Portugal. In some of these localities, *P. perniciosus* occurs sympatrically with other *Larrousius* vectors, namely *P. ariasi*, *P. perfiliewi* and *P. neglectus* [27,28,29,30,31]. Studies on the cross-reactivity of anti-*P. perniciosus* antibodies with the saliva of these sand fly species are hampered by difficulties in the maintenance of *Larrousius* colonies; however, based on studies with other sand flies [16,17,32], a certain level of cross-reactivity can be expected only in closely-related species. In this case, such cross-reactivity might be an advantage as all mentioned *Larrousius* species are known to be *L. infantum* vectors [5,27]. It is also important to point out that the specificity of the protein against sympatric sand fly species needs to be studied. Demonstrating sand fly exposure could be pivotal in the discrimination between vector-borne and direct (e.g. congenital, sexual) infections, the latter being hypothesized more and more to justify unexpected autochthonous canine leishmaniasis [33].

In conclusion, we have demonstrated that three denatured recombinant proteins from *P. perniciosus* saliva, the apyrases rSP01B and rSP01 and yellow protein rSP03B, are novel recombinant antigens with great promise in screening canine exposure to this important *L. infantum* vector and for estimating the risk of canine leishmaniasis in the western Mediterranean area.

## Acknowledgments

We would like to thank Dr. Dorothee Stanneck from the Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Germany for providing the canine sera.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PV MJ RM IR. Performed the experiments: JD IMM PS. Analyzed the data: JD IMM IR PV. Contributed reagents/materials/analysis tools: PV MJ RM. Wrote the paper: JD IMM PV MJ RM IR. Created figures: JD IMM. Created striking still image: JD.

## References

- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol 24: 324–30.
- Schantz PM, Steurer EJ, Duprey ZH, Kurpel KP, Barr SC, et al. (2005). Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. J Am Vet Med Assoc 226: 1316–22.
- Dujardin JC, Campino L, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, et al. (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. Emerg Infect Dis 14: 1013–8.
- Carranza-Tamayo CO, Carvalho Mdo S, Bredt A, Bofil MI, Rodrigues RM, Silva AD, et al. (2010). Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 43: 396–9.
- Killick-Kendrick R (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin Dermatol 17: 279–89.
- Hostomska J, Rohousova I, Volfova V, Stanneck D, Mencke N, et al. (2008). Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly Lutzomyia longipalpis. Vector Borne Zoonotic Dis 8: 443–50.
- Vlkova M, Rohousova I, Drahota J, Stanneck D, Kruehdewagen EM, et al. (2011). Canine antibody response to Phlebotomus perniciosus bites negatively correlates with the risk of Leishmania infantum transmission. PLoS Negl Trop Dis 5: e1344.
- Gomes RB, Mendonca IL, Silva VC, Ruas J, Silva MB, et al. (2007). Antibodies against Lutzomyia longipalpis saliva in the fox Cerdocyon thous and the sylvatic cycle of Leishmania chagasi. Trans R Soc Trop Med Hyg 101: 127–33.



9. Vlkova M, Rohousova I, Hostomska J, Pohankova L, Zidkova L, et al. (2012). Kinetics of antibody response in BALB/c and C57BL/6 mice bitten by *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1719.
10. Souza AP, Andrade BB, Aquino D, Entringer P, Miranda JC, et al. (2010). Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e649.
11. Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, et al. (2010). Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e638.
12. Martin-Martin I, Molina R, Jimenez M (2012). An insight into the *Phlebotomus perniciosus* saliva by a proteomic approach. *Acta Trop* 123: 22–30.
13. Volf P, Volfova V (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol* 36 Suppl 1: S1–9.
14. Molina R (1991). Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Research and Reviews in Parasitology* 51: 87–89.
15. Anderson JM, Oliveira F, Kamhawi S, Mans BJ, Reynoso D, et al. (2006). Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 7: 52.
16. Rohousova I, Ozensoy S, Ozbel Y, Volf P (2005). Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130: 493–9.
17. Drahota J, Lipoldova M, Volf P, Rohousova I (2009). Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. *Parasite Immunol* 12: 766–70.
18. Ribeiro JM, Mans BJ, Arca B (2010). An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 767–84.
19. Oliveira F, Kamhawi S, Seitz AE, Pham VM, Guigal PM, et al. (2006). From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 24: 374–90.
20. Hostomska J, Volfova V, Mu J, Garfield M, Rohousova I, et al. (2009). Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. *BMC Genomics* 10: 282.
21. Rohousova I, Subrahmanyam S, Volfova V, Mu J, Volf P, Valenzuela JG, et al. (2012). Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1660.
22. Volf P, Skarupova S, Man P (2002). Characterization of the lectin from females of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. *Eur J Biochem* 269: 6294–301.
23. Xu X, Oliveira F, Chang BW, Collin N, Gomes R, et al. (2011). Structure and function of a “yellow” protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. *J Biol Chem* 286: 32383–93.
24. Gomes R, Oliveira F, Teixeira C, Meneses C, Gilmore DC, et al. (2012). Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted leishmania conferring ulcer-free protection. *J Invest Dermatol* 132: 2735–43.
25. Martin-Martin I, Molina R, Jiménez M (2013). Molecular and Immunogenic Properties of Apyrase SP01B and D7-Related SP04 Recombinant Salivary Proteins of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid, Spain. *BioMed Research International* 2013: 526069.
26. Ryoichi Hamasaki, Hirotomo Kato, Yoshimi Terayama, Hiroyuki Iwata, Jesus G. Valenzuela (2009). Functional characterization of a salivary apyrase from the sand fly, *Phlebotomus duboscqi*, a vector of *Leishmania major*. *J Insect Physiol* 55: 1044–1049.
27. Ready PD (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* 15: 19505.
28. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, et al. (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health* 13: 256–64.
29. Baron SD, Morillas-Marquez F, Morales-Yuste M, Diaz-Saez V, Irigaray C, et al. (2011). Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology* 138: 1234–44.
30. Hartemink N, Vanwambeke SO, Heesterbeek H, Rogers D, Morley D, et al. (2011). Integrated mapping of establishment risk for emerging vector-borne infections: a case study of canine leishmaniasis in southwest France. *PLoS One* 6: e20817.
31. Branco S, Alves-Pires C, Maia C, Cortes S, Cristovao JM, et al. (2013). Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Trop* 125: 339–48.
32. Volf P, Rohousova I (2001). Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122: 37–41.
33. Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, et al. (2011). Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis* 5(4):e1019.



# High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain



Inés Martín-Martín<sup>a</sup>, Ricardo Molina<sup>a,\*</sup>, Iva Rohoušová<sup>b</sup>, Jan Drahota<sup>b</sup>, Petr Volf<sup>b</sup>, Maribel Jiménez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 18 October 2013

Received in revised form 6 February 2014

Accepted 16 February 2014

### Keywords:

*Phlebotomus perniciosus*

Recombinant salivary proteins

Marker of exposure

Hare

Rabbit

Dog

## ABSTRACT

From July 2009 to date, a leishmaniosis outbreak has occurred in the south-west of the Madrid region (Spain) and has already accounted for more than 450 human cases in an area that comprises a population of approximately 500,000. The causative agent is *Leishmania infantum* and the main vector in the area is *Phlebotomus perniciosus*. Although canine leishmaniosis prevalence in the focus is not higher than the average in the Madrid region, a wild reservoir – the hare – has been implicated. In this study, we examined the exposure of *Leishmania* reservoirs in the area: dogs, hares, and wild rabbits to sand fly bites using the detection of specific IgG antibodies against *P. perniciosus* salivary gland homogenate or recombinant salivary proteins.

Hares collected in a green park adjacent to the focus ( $n=59$ ) showed positive exposure to *P. perniciosus* bites in comparison to hares from a non-endemic area (Czech Republic,  $n=18$ ). A significant positive correlation was found between IgG response to yellow protein rSP03B and salivary gland homogenate ( $r=0.902$ ) and between apyrase rSP01B and salivary gland homogenate ( $r=0.710$ ). Wild rabbits captured in the study area ( $n=21$ ) presented higher anti-saliva antibody levels than negative control sera and their IgG response against recombinant salivary proteins were positively correlated with salivary gland homogenate (rSP03B:  $r=0.710$ ; rSP01B:  $r=0.666$ ). All sera of dogs from the focus ( $n=34$ ) showed higher anti-saliva IgG levels than that of non-exposed dogs. Moreover, dogs protected against sand fly bites through the use of topical insecticides and sleeping indoors showed significantly lower antibody levels than the non-protected ones. Antibody response to all three recombinant salivary proteins tested showed positive correlation with salivary gland extract (rSP03B:  $r=0.858$ ; rSP01:  $r=0.864$ ; and rSP01B:  $r=0.861$ ). Data confirmed the exposure of hares, rabbits and dogs to *P. perniciosus* bites in the context of an outbreak of human leishmaniosis in Spain, highlighting their involvement in *Leishmania* transmission by supporting their role as potential reservoirs.

This novel methodology represents a promising tool for further epidemiological studies that would help to design better strategies for the control of leishmaniosis in this area and other foci.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Tel.: +34918223674; fax: +34915097034.

E-mail addresses: [rmolina@isci.es](mailto:rmolina@isci.es) (R. Molina), [mjimenez@isci.es](mailto:mjimenez@isci.es) (M. Jiménez).

## 1. Introduction

Human leishmaniasis is an endemic disease in southern Europe, where the parasite – *Leishmania infantum* – acts as the causative agent while several species of phlebotomine sand flies belonging to the genus *Phlebotomus* serve as vectors. It is considered a zoonotic disease, the dog being the main reservoir (WHO, 2010). In Western Mediterranean countries, sand fly activity is seasonal and the winter corresponds to a sand fly free period. The incidence of visceral leishmaniasis in Europe was recently revised and established between 0.02 and 0.49/100,000 inhabitants per year (Alvar et al., 2012). However, cutaneous leishmaniasis is not frequently notified (Antoniou et al., 2013). Currently, Europe is facing demographic, environmental, climatic and urbanization modifications that are leading to a change in the disease distribution. Expansion of leishmaniasis cases to non-endemic areas in Italy and France has also been documented (Maroli et al., 2008; Dereure et al., 2009; Gramiccia et al., 2013). The emergence of human leishmaniasis foci in Crete, Cyprus and Spain provides clear examples of the dynamic nature of leishmaniasis in Europe (Antoniou et al., 2013).

In the recently described focus in the south-western area of the Madrid region (Spain), 446 cases were reported from July 2009 to December 2012 (6 in 2009, 97 in 2010, 196 in 2011 and 147 in 2012) affecting four municipalities (Fuenlabrada, Leganés, Getafe and Humanes de Madrid) (Arce et al., 2013). Between 12 and 25 cases were notified annually in Madrid for the period of 2000–2009 leading to an increased incidence in the Fuenlabrada municipality from 2.44/100,000 inhabitants in 2009 to 54.2/100,000 inhabitants in 2013 (Antoniou et al., 2013). As expected, *L. infantum* is the parasite species involved in the leishmaniasis focus (Chicharro et al., 2013). Entomological research has determined that the vector is *Phlebotomus perniciosus*, the predominant species in the area (66.1%) where high densities (143.8 sand flies/m<sup>2</sup> in 2012) were found (Arce et al., 2013). Moreover, molecular detection of *L. infantum* in wild-caught *P. perniciosus* ( $n = 135$ ) showed a high prevalence of infection (58.5%), providing evidence of the high transmission events that are taking place in the focus (Jiménez et al., 2013).

The data derived from the analysis of 2070 dogs studied in 2011 and 2012 revealed a low canine seroprevalence of 1.64% in the affected municipalities (Vilas et al., 2012). Therefore, wider studies focusing on potential wild reservoirs resulted in *Leishmania* DNA detection in the spleen and/or skin as well as anti-*Leishmania* antibodies in hares, rabbits and cats (Vilas et al., 2012; Moreno et al., 2014). In addition, xenodiagnosis studies have, for the first time, demonstrated that apparently healthy Iberian hares (*Lepus granatensis*), seropositive to *L. infantum*, were able to infect *P. perniciosus* (Molina et al., 2012). Recent observations on *P. perniciosus* blood meal preferences (Jiménez et al., 2013) and the high population of hares present in the newly constructed periurban green park surrounded by the aforementioned municipalities suggest that hares maintain a high sand fly population in the area and play an active role as reservoirs in a sylvatic transmission cycle linked to the urban periphery, independent of the usual domestic cycle

(Molina et al., 2012; Jiménez et al., 2013). A recent study based on molecular detection of the parasite in the spleen of hares captured in different areas of Spain showed a high prevalence of infection (43.6%) in *L. granatensis* and *Lepus europaeus* (Ruiz-Fons et al., 2013).

One of the tools that can be implemented for a leishmaniasis outbreak follow up is detecting the exposure of hosts to leishmaniasis vectors. In this aspect, sand fly salivary proteins were introduced as markers of exposure to sand flies (Barral et al., 2000; Rohoušová et al., 2005; Rohoušová and Volf, 2006; Gomes and Oliveira, 2012). Hosts bitten by sand flies developed specific anti-saliva antibody responses that correlated with the number of bites received (Vinhas et al., 2007; Hostomská et al., 2008; Vlková et al., 2011, 2012). Therefore, host exposure to sand flies can be tracked by evaluating humoral responses against salivary antigens and is being applied using salivary gland homogenate (SGH) (Barral et al., 2000; Clements et al., 2010; Souza et al., 2010; Teixeira et al., 2010; Gidwani et al., 2011) or recombinant salivary proteins (rSP) (Barral et al., 2000; Marzouki et al., 2012; Souza et al., 2010; Vlková et al., 2012). This epidemiological tool has already been used to assess the efficacy of vector control campaigns in endemic areas (Gidwani et al., 2011). Moreover, searching for antibodies against the saliva of blood-feeding insects seems to be a novel approach for the identification of new reservoirs. For instance, detectable levels of antibodies against the saliva of *Lutzomyia longipalpis* present in sera of wild foxes (*Cerdocyon thous*) together with parasite detection in these animals suggested the presence of a sylvatic transmission cycle of *L. infantum* in Brazil (Gomes et al., 2007).

Therefore, the main objective of this study was to analyze the exposure to sand fly bites of the *Leishmania* reservoirs in the focus of Madrid: dogs, hares and a potential reservoir the wild rabbit through the detection of antibodies against *P. perniciosus* SGH and rSP in sera of these animals.

## 2. Material and methods

### 2.1. Salivary gland collection from sand flies

*P. perniciosus* sand flies were maintained at 27 °C and 17:7 h light:darkness photo-period in the Medical Entomology Unit of the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain. Sand flies from a colony established from specimens captured in Madrid (Molina, 1991) were used. Salivary glands were dissected from 3 to 5 day-old adult female flies and stored at –70 °C in 20 µl of Tris–NaCl buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) in groups of 20 salivary glands until used. SGH was obtained by disrupting the glands through three repeated freeze/thaw cycles.

### 2.2. Recombinant salivary proteins

Recombinant salivary proteins from *P. perniciosus*, two apyrases, rSP01 and rSP01B (35.5 kDa, GenBank ID: KF257365 and 35.3 kDa, GenBank ID: KF257364, respectively) and a yellow protein rSP03B (43 kDa, GenBank ID: KF257369) obtained from the Laboratory of Vector Biology (Charles University in Prague) were used in denatured

forms (Drahota et al., 2014). In addition, the apyrase rSP01B (35.5 kDa, GenBank ID: KF178455) in its refolded form was produced at the Medical Entomology Unit, ISCIII, (Martín-Martín et al., 2013).

Proteins in their denatured form (both apyrases and the yellow protein) were used for reaction with canine sera as they had been previously assayed as markers of canine exposure to *P. perniciosus* bites (Drahota et al., 2014). On the other hand, the reactivity of the yellow protein in its denatured form and the apyrase in a refolded form (rSP01B) was tested against sera of wild hares and rabbits.

### 2.3. Sera of wild and domestic animals

#### 2.3.1. Hares and rabbits

Sera were collected from wild hares ( $n = 59$ ) and rabbits ( $n = 21$ ) captured in the green park adjacent to the Fuenlabrada and Leganés municipalities (south-western Madrid region). All hares and 13 rabbits were captured during the winter of 2011/2012. Sera from an additional 8 rabbits captured in March 2013 were also used. Sera of hares from the Czech Republic ( $n = 18$ ) and rabbits maintained at the animal facilities of ISCIII ( $n = 11$ ) served as negative controls. Serum from a rabbit experimentally exposed to *P. perniciosus* bites was used as a positive control.

#### 2.3.2. Dogs

Sera of healthy dogs ( $n = 34$ ) living in the leishmaniosis focus area were also studied. Blood samples were collected during the annual anti-rabies vaccination campaign carried out from May to July 2012 in the Fuenlabrada and Leganés municipalities. Simultaneously, *Leishmania* diagnosis was performed as a part of a *Leishmania* screening campaign on domestic dogs. All dogs included in the study were seronegative for *Leishmania*, as canine leishmaniosis prevalence was too low (Vilas et al., 2012). Therefore, we did not intend to include a relationship between the anti-sand fly saliva antibody levels and *Leishmania* infection.

Serodiagnosis was conducted by detecting specific antibodies against *L. infantum* either by rK39 immunochromatographic test (Kalazar Detect Canine Rapid Test; Inbios) performed by the veterinarian immediately after blood collection, or by using the indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) at the WHO Collaborating Centre for Leishmaniosis (ISCIII) according to standard procedures (Alvar et al., 2004). The cut off value indicating a positive result was set at 1:80, which is the internationally accepted IFAT limit (Franco et al., 2011).

Based on the epidemiological information acquired during the blood sample collection, the dogs were classified into two groups according to their potential level of exposure to sand fly bites, as outlined in Table 1. Therefore, young and asymptomatic dogs were included in the low exposure group when meeting certain criteria such as sleeping indoors, treatment with topical insecticides and a history of no travel to other leishmaniosis endemic areas. Additionally, the lack of relation between these dogs and human or canine leishmaniosis cases was established as the owners and other dogs residing in the same household were not leishmaniosis cases. On the other hand, dogs that were not treated with topical insecticides and/or

**Table 1**

Classification of dogs according to their potential exposure to sand fly bites.

Level of exposure of dogs to sand fly bites	Number of dogs	Criteria
Low	17	Age < 2 years; asymptomatic; treatment with insecticides; sleeping indoors; negative serology to <i>Leishmania</i> (immunochromatography rK39 and IFAT); no history of travel; no relation with human or canine leishmaniosis cases.
High	17	Asymptomatic; either lack of treatment with insecticides and/or sleeping outdoors; negative serology to <i>Leishmania</i> (immunochromatography rK39 and IFAT).

slept outdoors were regarded as the high exposure group. Moreover, sera of 6 non-exposed dogs to *P. perniciosus* bites were used as negative controls (Vlková et al., 2011).

All animals used in the study were cared for in accordance with standards specified in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals and approved by ethical committees for animal care and experimentation.

### 2.4. ELISA

Specific anti-saliva IgG antibodies were measured by ELISA, according to Rohoušová et al. (2005) with minor modifications. Briefly, microtiter plates (Maxisorp, Nunc) were coated either with SGH (0.5 salivary gland per well) or rSP in carbonate buffer ( $\text{NaHCO}_3$  28 mM,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM; pH 9.5) overnight at 4 °C. Recombinant salivary proteins were used as follows: denatured apyrases rSP01 and rSP01B (6 µg/ml and 9 µg/ml, respectively); denatured yellow protein rSP03B (3 µg/ml) and refolded apyrase rSP01B (35 µg/ml). The plates were blocked with 6% skimmed milk in PBS-Tw at 37 °C for 1 h, washed twice with PBS-Tween (PBS-Tw) and sera diluted in PBS-Tw (1:50) was incubated at 37 °C during 3 h. After repeated washings, goat anti-rabbit IgG (1:2,500, Southern Biotech), or goat anti-dog IgG (1:1,000, Bethyl Laboratories) peroxidase-conjugated antibodies were incubated for 1 h at 37 °C. Following another washing cycle, the plates were developed with orthophenyldiamine (0.5 mg/ml) in McIlwain phosphate citrate buffer (pH 5.5) in the presence of 0.001% (v/v) of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). The reaction was stopped with 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and absorbance was measured at 492 nm using an ELISA reader (ELx800, BioTek). Each serum was tested in duplicate and the experiment was repeated at least twice. Wells without serum (but coated with SGH) served as negative controls. IgG antibody levels are reported as adjusted OD, calculated for each serum as a mean OD value of the duplicated wells minus the OD value of the control wells.

## 2.5. Western blot

SGH (20 glands per well) or rSP (4 and 9 µg per well for rSP03B and rSP01B, respectively), were separated by SDS PAGE on 12% polyacrylamide gels under denaturing conditions using the Mini-PROTEAN apparatus (Bio-Rad). Proteins were quantified by the Lowry method (Lowry et al., 1951). Protein bands were either stained by Coomassie brilliant Blue (Bio-Rad) for protein visualization or transferred to Amersham Hybond™-P membranes (GE Healthcare). Membranes were then cut into strips (the area corresponding to one well of the 10 well-comb was cut into 5 strips) and blocked at room temperature for 1 h with 5% milk in 0.05% Tris-Tween buffer (Tris-Tw) for Western blot. After washing in Tris-Tw, membranes were incubated for 1 h with diluted sera (1:50). The strips were repeatedly washed and incubated for 1 h with peroxidase conjugated anti-rabbit IgG (1:1,000, Sigma). Immunogenic protein bands were visualized by substrate solution with diaminobenzidine (Sigma) and the reaction was stopped with distilled water.

## 2.6. Statistical analysis

The non-parametric Mann–Whitney *U* test was performed to statistically compare sets of groups without assuming Gaussian distribution. Spearman *t* test was chosen to establish correlations between two data sets. Both statistical analyses were done using Prism version 5 (GraphPad Software). Statistical significance was considered when the *p*-value was <0.05.

## 3. Results

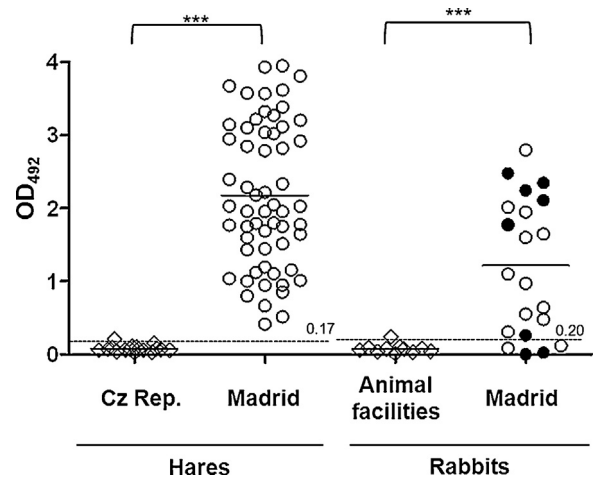
### 3.1. Exposure of wild animals to sand fly bites

ELISA of all hare sera from the focus displayed significantly higher IgG anti-saliva antibody levels than negative controls from the non-endemic area ( $p < 0.0001$ ). All values were greater than the cut off set at  $OD_{492} = 0.17$ , ranging from low ( $OD_{492} = 0.42$ ) to very high positives ( $OD_{492} = 3.95$ ) (Fig. 1).

The majority of rabbit sera ( $n = 17$ ; 81%) showed anti-saliva antibody levels above the cut off ( $OD_{492} = 0.20$ ), established with sera of non-exposed rabbits from the animal facilities ( $p < 0.0001$ ). The absorbance values varied more than in hares. However, the maximum antibody levels were lower (Fig. 1). No difference was found between anti-saliva antibody values from rabbits captured in 2011/2012 versus 2013 ( $p = 0.59$ ) (Fig. 1).

Sera of both wild hares and rabbits recognized several *P. perniciosus* salivary proteins as demonstrated by the Western blot (Fig. 2). Sera of hares mostly recognized the 48, 44, 31 and 27 kDa protein bands while the most antigenic ones for wild rabbits appeared at 48, 44, 37, 31 and 29 kDa. Apart from these five protein bands, the serum of experimentally exposed rabbit recognized additional bands at 41, 35, 33 and 24 kDa.

There was a significant correlation between IgG antibodies against recombinant salivary proteins (rSP03B and rSP01B) and the total anti-SGH antibodies ( $p < 0.0001$ ).



**Fig. 1.** Anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva IgG antibody levels in sera of 59 hares and 21 rabbits. (○) Sera of wild animals collected during winter 2011/12; (●) Sera of wild animals collected in March 2013; (◇) Sera of non-exposed animals. 0.17 OD and 0.20 OD cut off values were established with sera of non-exposed hares and rabbits, respectively. Bars indicate the mean values. Statistically significant differences between groups are marked by \*\*\* signs ( $p < 0.0001$ ).

Spearman correlation test results for the rSP03B yellow protein were  $r = 0.902$  and  $r = 0.710$  for hares and rabbits, respectively, while the rSP01B apyrase showed values of  $r = 0.710$  and  $0.666$ , respectively (Fig. 3). In addition, both rSP (35.3 kDa for the apyrase and 43 kDa for the yellow protein) were recognized by sera of most of the wild animals (Fig. 4).

### 3.2. Exposure of domestic dogs to sand fly bites

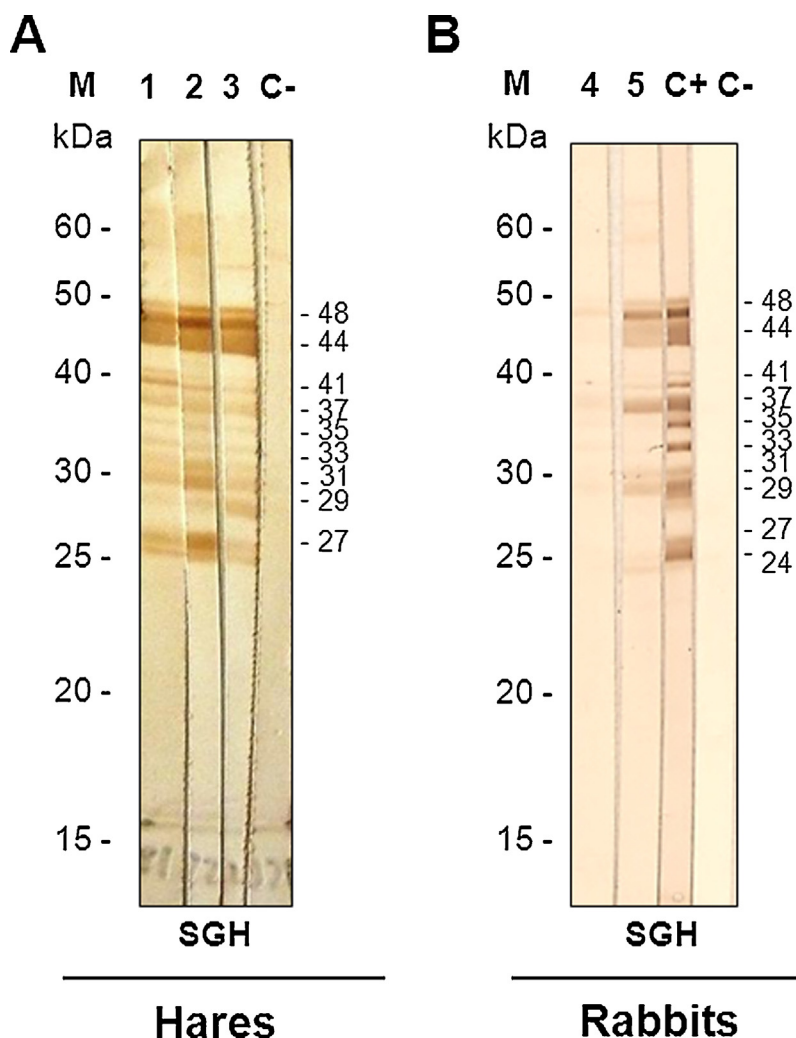
Sera from dogs in the leishmaniosis focus area ( $n = 34$ ) showed significantly higher anti-saliva antibody levels than the non-exposed dogs (cut off = 0.24,  $p < 0.0001$ ), (Fig. 5A). Additionally, dogs partially protected against sand fly bites through both the use of topical insecticides and by sleeping indoors showed significantly lower antibody levels than the non-protected ones ( $p = 0.021$ , Fig. 5B).

The three rSP tested, the apyrases rSP01 and rSP01B, and the yellow protein rSP03B, showed a significant positive correlation with the salivary gland extract ( $r = 0.864$ ,  $0.861$  and  $0.858$ , respectively;  $p < 0.0001$ ). The lowest data dispersion corresponds to the recombinant yellow protein (Fig. 6).

## 4. Discussion

This study shows that domestic (dogs) as well as wild animals (hares and rabbits) are exposed to *P. perniciosus* bites in the active leishmaniosis focus in Madrid. Particularly, the results indicate that all hares were exposed to *P. perniciosus*, reinforcing the hypothesis of the existence of a sylvatic cycle independent of the domestic cycle (Molina et al., 2012). Furthermore, the wide range of anti-saliva antibody levels seen in hares and rabbits indicates different ranges of exposure. Anti-rabbit conjugate was used for IgG detection in sera of leporids, as it had also been shown



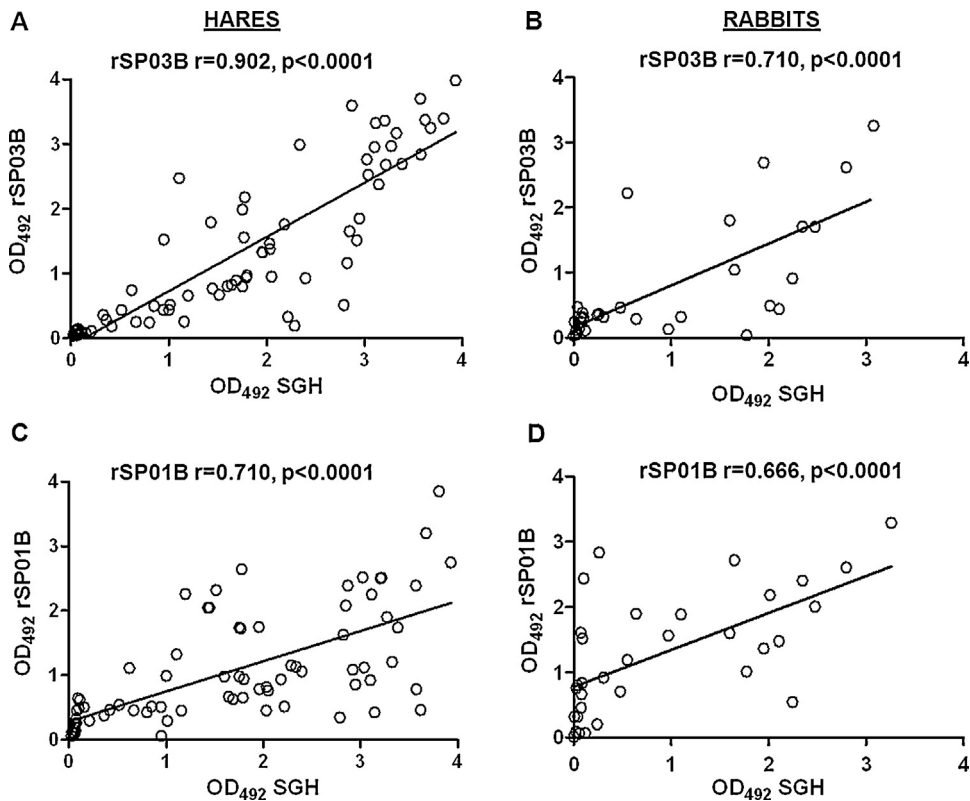


**Fig. 2.** Panel (A): Western blot of *Phlebotomus perniciosus* SGH with sera of wild hares, designated as 1, 2 and 3. (C-) Negative control serum from a non-exposed hare from the Czech Republic. Panel (B): Western blot of *P. perniciosus* salivary gland homogenate with sera of wild rabbits, indicated as 4 and 5. (C+) Positive serum from a rabbit experimentally bitten by sand flies; (C-) Negative serum from a non-exposed rabbit from the animal facilities. (M) Molecular weight marker Precision Dual Xtra Plus (Bio-Rad).

adequate for IgG detection in hares (Gustafsson et al., 1997; Moreno et al., 2014). Higher anti-saliva levels have been detected in hares over rabbits. However, a higher exposure of hares to sand fly bites cannot be concluded as there might be different affinity/reactivity of rabbit conjugate with hare sera versus rabbit sera or even different antigenicity of salivary proteins for hares and rabbits as observed by Western blot (Fig. 2). Interestingly, hares and rabbits were captured during winter, showing that high anti-saliva antibody levels persisted in sera of wild animals at least from late October, the end of the sand fly season in the Madrid region (Gálvez et al., 2010) until the following winter, when the animals were captured. To date, only a few studies have focused on the kinetics of anti-saliva antibodies (Vinha et al., 2007; Hostomská et al., 2008; Vlková et al., 2011; Vlková et al., 2012) and to our knowledge, no data regarding the kinetics of specific anti-sand fly antibodies in leporids is available. Therefore, it was not possible to link the high

antibody levels observed in sera of hares and rabbits with sand fly salivary antibody kinetics.

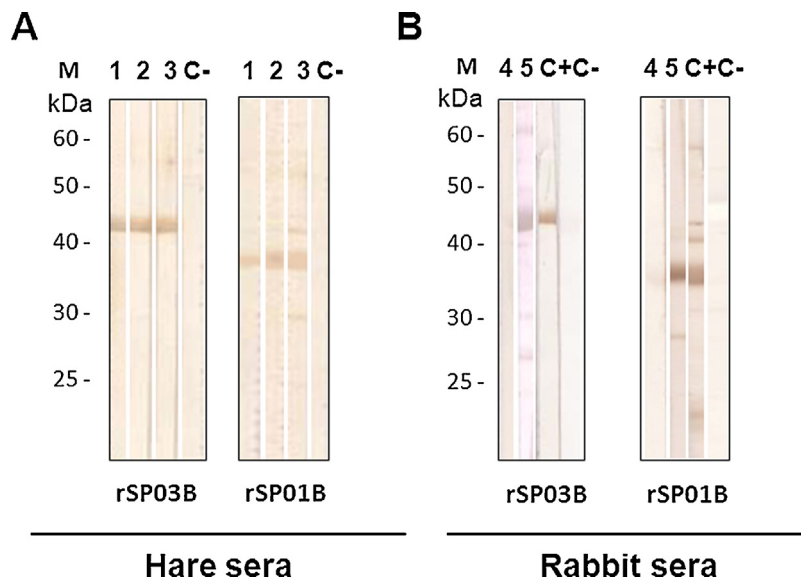
In the Iberian Peninsula, infection by *L. infantum* has been described in various species of wild carnivores (Sobrino et al., 2008) and other animals including rodents, horses, sheep and goats (Portús et al., 2002; Fernández-Bellón et al., 2006), suggesting the existence of other independent transmission cycles than just the domestic one. Iberian hares (*L. granatensis*) have been recently identified as active reservoirs in the aforementioned outbreak (Molina et al., 2012) and a high probability of a northward expansion of the Iberian hare was predicted for the future (Acevedo et al., 2012). Also, the European hare (*L. europaeus*) seems to be able to accommodate *L. infantum* infection as well (Ruiz-Fons et al., 2013). Therefore, control measures are essential to reduce this newly described and versatile reservoir and to determine their epidemiological role in other leishmaniasis endemic regions.



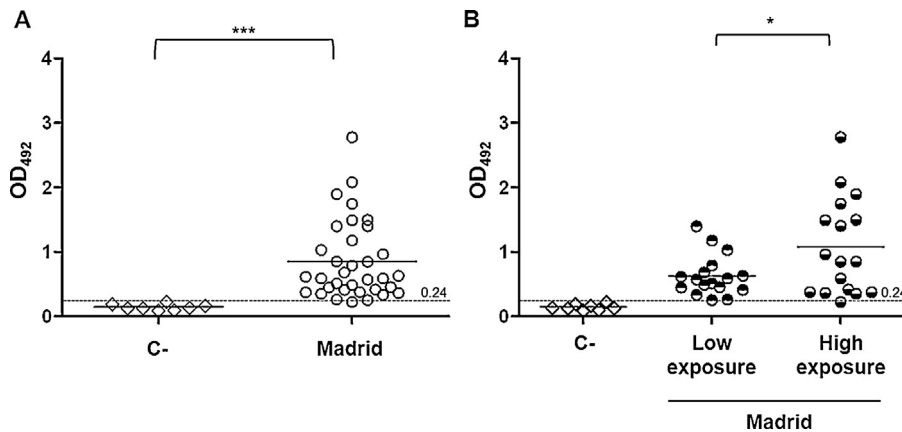
**Fig. 3.** Correlation between IgG antibodies against SGH and rSP, rSP03B and rSP01B using sera of hares (Panels A and C) or rabbits (Panels B and D).

In rabbits, a single *Leishmania* PCR positive animal (1 out of 162) was reported in southern Spain (Chitimia et al., 2011) and it was hypothesized that they would act as accidental hosts rather than as active reservoirs. Recently,

anti-*L. infantum* seroreactivity was detected in 45.7% of rabbits (16 out 35) captured in the focus area of southwestern Madrid (Moreno et al., 2014). Although hares and rabbits belong to the same family (Leporidae), they exhibit



**Fig. 4.** Panel (A): Western blot of *Phlebotomus perniciosus* rSP - rSP03B and rSP01B- with sera of wild hares, designated as 1, 2 and 3. (C-) Negative control serum from a non-exposed hare from the Czech Republic. Panel (B): Western blot of *P. perniciosus* salivary gland homogenate with sera of wild rabbits, indicated as 4 and 5. (C+) Positive serum from a rabbit experimentally bitten by sand flies; (C-) Negative serum from a non-exposed rabbit from the animal facilities. (M) Molecular weight marker Precision Dual Xtra Plus (Bio-Rad).



**Fig. 5.** Anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva IgG antibody levels in sera of 34 dogs from Madrid. Panel (A): (○) Sera from dogs living in Madrid ( $n=34$ ) plotted together; (◇) Sera of non-exposed dogs ( $n=8$ ). Panel (B): Sera of 34 dogs grouped according to their expected exposure to sand fly bites; (◐) Sera of low exposure group; (●) Sera of high exposure group; (◇) Sera of non-exposed dogs ( $n=8$ ). 0.24 cut off value set with sera of non-exposed dogs (◇). Bars indicate the mean values. Statistically significant differences between groups: \*\*\*  $p < 0.0001$  or \*  $p < 0.05$ , respectively.

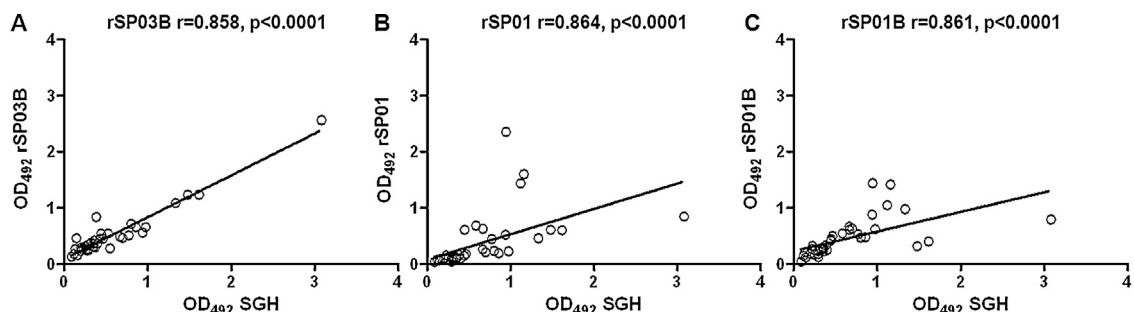
remarkable differences in immune responses (Carmo et al., 2006) and may respond to *Leishmania* parasites in a different manner (Moreno et al., 2014). Rabbits are known as highly attractive hosts and a good blood meal source for *Larroussius* species (Killick-Kendrick and Killick-Kendrick, 1991; Benito-De Martín et al., 1994; Volf and Volfova, 2011). Our results indicate that wild rabbits are frequently bitten by *P. perniciosus*, therefore they probably contribute to maintaining high population levels of sand flies in the focus.

Throughout 2012, several control measures were performed in the focus area of south-western Madrid in order to halt the spread of this epidemic (Suárez-Rodríguez et al., 2012). Therefore, differences in reservoir exposure due to a reduced sand fly density would be expected when analyzing animals captured before and after the control measures. However, no differences were found between exposure results of rabbits captured in 2011/2012 versus 2013. Nevertheless, these results may have been hampered by the small numbers of rabbit sera samples available from each year (2011/2012 and 2013). Clearly, more research is needed in order to clarify the role of rabbits in the leishmaniosis epidemiology of this focus.

*P. perniciosus* salivary antigens immunogenic to hares and rabbits were identified by Western blot. Interestingly, sera from these leporids showed a different pattern of recognition in terms of intensity and immunogenicity.

The most antigenic bands appeared at 48, 44, 37, 31 and 27–29 kDa. Based on their coincident molecular weight and on previous experiments regarding salivary antigen proteomic identifications, 48 and 44 kDa bands correspond to yellow proteins (Anderson et al., 2006; Vlková et al., 2011; Martín-Martín et al., 2012) while 35–37 kDa bands may represent apyrases, and 27–29 kDa bands correspond to D7-related proteins and Par25-like proteins. These proteins have been previously identified as antigens in the saliva of *P. perniciosus* using sera of naturally or experimentally bitten hosts (Rohoušová and Volf, 2006; Vlková et al., 2011; Martín-Martín et al., 2012).

Results obtained from dogs living in the focus area showed that these animals were exposed to sand fly bites as their level of anti-saliva antibodies was higher than the cut off established with sera of the non-exposed dogs. Although anti-saliva antibodies can persist until the following sand fly season (Hostomská et al., 2008), it can be assumed that these values correspond at least partially to recent exposure, as canine sera were collected within the sand fly season. As expected, dogs belonging to the group of low potential exposure to sand fly bites showed lower anti-saliva antibody levels than those that were not treated with topical insecticides and/or slept outdoors. Our results supported previous observations by other authors that insecticide-treated dogs received fewer sand fly bites than non-treated ones but still developed



**Fig. 6.** Correlation between IgG antibodies against SGH and rSP in denatured form rSP03B (Panel (A)), rSP01 (Panel (B)) and rSP01B (Panel (C)) using canine sera.



a low IgG response against sand fly saliva (Hostomská et al., 2008; Vlková et al., 2011). Therefore, these previous observations done with experimentally-bitten dogs were confirmed in our study with naturally-exposed dogs for the first time. Insecticide treatments are widely accepted as the main strategy to control canine reservoir and thus reduce human risk of disease (Alexander and Maroli, 2003). Therefore, monitoring anti-saliva antibodies in canine sera would provide valuable information on control programs efficacy in this focus. Unfortunately, in this study reliable information about anti-saliva response in infected dogs could not be determined, as the canine leishmaniosis prevalence was too low, probably due to the effectiveness of measures taken by owners to protect their dogs against the bite of sand flies in the focus area.

In this study, rSP03B (yellow protein), rSP01 and rSP01B (apyrases) were used in different forms. Proteins in the denatured form were chosen for reaction with canine sera as they had been previously selected as the best markers of canine exposure to *P. perniciosus* bites (Drahota et al., 2014). For wild animals, denatured rSP03B and refolded rSP01B were used. In wild leporids, antibodies against both denatured yellow protein rSP03B and refolded apyrase rSP01B showed a positive correlation with anti-SGH antibodies detected in sera of hares and rabbits. The yellow protein showed the best results for both hares and rabbits, as they presented greater correlation scores when values were compared with SGH. In addition, immunogenicity of these two proteins was confirmed by Western blot. These findings support the idea of replacing the use of SGH by rSP. Apyrases are enzymes typically found in the saliva of sand flies and bed bugs and act as antihemostatic factors by hydrolyzing ATP and ADP. Yellow proteins are widespread within the saliva of insects and their name is derived from the yellow phenotype produced by the mutation of the gene involved. Both protein families are immunogenic to several vertebrate hosts (Drahota et al., 2014; Rohoušová et al., 2012). Recombinant yellow proteins have been successfully tested by others as markers of exposure to sand fly bites (Souza et al., 2010; Vlková et al., 2012). On the other hand, the apyrase rSP01B in its refolded form was shown in previous studies to successfully correlate with salivary gland extract in the murine model but not in the canine one (Drahota et al., 2014). In this study, immunogenicity of rSP01B was confirmed in other reservoirs such as hares and rabbits and it is not surprising as differences in salivary protein recognition patterns by sera of different hosts have been previously documented (Rohoušová et al., 2005; Martín-Martín et al., 2012). In canine sera, high correlation values between antibody levels against rSP and anti-saliva antibodies were obtained for the three assayed proteins as previously observed with experimentally bitten dogs (Drahota et al., 2014), thus confirming the use of these rSP for field applications. The assayed proteins showed similar correlation values with anti-saliva antibodies (rSP01:  $r=0.864$ , rSP01B:  $r=0.861$  and rSP03B:  $r=0.858$ ). However, the recombinant yellow protein seems to be the best candidate as marker of canine exposure to sand fly bites since it presents the lowest data dispersion.

In the case of *Leishmania* detection in vertebrate hosts, previous contact with sand flies is mandatory. However, in the absence of *Leishmania* infection, a positive exposure of vertebrate hosts to sand fly bites can still happen. In this way, detecting sand fly saliva humoral responses in different hosts would contribute to a better understanding of the eco-epidemiology of the disease, with special importance in the aforementioned emerging outbreak.

## 5. Conclusions

Our results confirmed the exposure of dogs, hares, and rabbits to *P. perniciosus* bites through this novel methodology. This is the first report of anti-saliva antibody levels in naturally bitten domestic and wild animals in Spain and can be considered as a valuable starting point for future studies on the efficacy of anti-vector control measures, especially in the context of an outbreak of human leishmaniosis. In addition, the use of rSP as markers of exposure to sand fly bites was successfully confirmed and validated in animals from the field.

As no data on kinetics of anti-saliva antibodies in wild animals are available, studies on this topic would be essential to supplement field work.

## Acknowledgments

This study was partially funded by the Spanish Ministry of Science & Innovation (Project AGL2008-01592), the Madrid community (Spain) and by the EU grant FP7-2011-261504 EDENext. The paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext185 (<http://www.edenext.eu>). We would like to thank Drs. Javier Nieto, Carmen Chicharro, Mercedes Domínguez, Alfredo Toraño and Inmaculada Moreno from the ISCIII; VISAVET as well as colleagues from the Madrid community for their support and for supplying valuable material regarding sera of animals from Madrid.

## References

- Acevedo, P., Melo-Ferreira, J., Real, R., Alves, P.C., 2012. Past, present and future distributions of an Iberian Endemic, *Lepus granatensis*: ecological and evolutionary clues from species distribution models. *PLoS One* 7, e51529. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051529>.
- Alexander, B., Maroli, M., 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 17, 1–18.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., The WHO Leishmaniasis Control Team, 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>.
- Anderson, J.M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B.J., Reynoso, D., Seitz, A.E., Lawyer, P., Garfield, M., Pham, M., Valenzuela, J.G., 2006. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 7, 52.
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., Volf, P., 2013. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Eurosurveillance* 18 (30). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20540&pii=20540>.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobás, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A.M., Pérez, A.M., Aránguez, E., Irioso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F., 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid,

- Spain, 2009 to 2012. *Eurosurveillance* 18 (30). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20546> pii=20546.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E.D., Valenzuela, J.G., Charlab, R., Barral-Netto, M., Ribeiro, J.M., 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 740–745.
- Benito-De Martín, M.I., Gracia-Salinas, M.J., Molina-Moreno, R., Ferrer-Dufol, M., Lucientes-Curdi, J., 1994. Influence de la nature du sang ingéré sur les paramètres gonotrophiques de *Phlebotomus perniciosus* sous conditions de laboratoire. *Parasite (Paris, France)* 1, 409–411.
- Carmo, C.R., Esteves, P.J., Ferrand, N., van der Loo, W., 2006. Genetic variation at chemokine receptor CCR5 in leporids: alteration at the 2nd extracellular domain by gene conversion with CCR2 in *Oryctolagus*, but not in *Sylvilagus* and *Lepus* species. *Immunogenetics* 58 (5–6), 494–501.
- Clements, M.F., Gidwani, K., Kumar, R., Hostomska, J., Dinesh, D.S., Kumar, V., Das, P., Muller, I., Hamilton, G., Volfova, V., Boelaert, M., Das, M., Rijal, S., Picado, A., Volf, P., Sundar, S., Davies, C.R., Rogers, M.E., 2010. Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 801–807.
- Chicharro, C., Llanes-Acevedo, I.P., García, E., Nieto, J., Moreno, J., Cruz, I., 2013. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Eurosurveillance* 18 (30). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20545> pii=20545.
- Chitimia, L., Muñoz-García, C.I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., Del Río, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Giménez-Font, P., Jiménez-Montalbán, P., Martínez-Ramírez, A., Meseguer-Meseguer, J.M., García-Bacete, I., Sánchez-Isarría, M.A., Sanchís-Monsonis, G., García-Martínez, J.D., Vicente, V., Segovia, M., Berriatua, E., 2011. Cryptic Leishmaniasis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 181, 12–16.
- Dereure, J., Vanwambeke, S.O., Male, P., Martínez, S., Pratlong, F., Balard, Y., Dedet, J.P., 2009. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9 (6), 687–694. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2008.0126>.
- Drahota, J., Martín-Martín, I., Sumova, P., Rohousova, I., Jiménez, M., Molina, R., Volf, P., 2014. Recombinant antigens from *Phlebotomus perniciosus* saliva as markers of canine exposure to visceral leishmaniasis vector. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2597.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gállego, L., Bardagi, M., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., 2006. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet. Parasitol.* 135, 181–185.
- Franco, A.O., Davies, C.R., Mylne, A., Dedet, J.P., Gallego, M., Ballart, C., Gramiccia, M., Gradoni, L., Molina, R., Galvez, R., Morillas-Marquez, F., Baron-Lopez, S., Pires, C.A., Afonso, M.O., Ready, P.D., Cox, J., 2011. Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitology*, 1–14.
- Gálvez, R., Descalzo, M.A., Miró, G., Jiménez, M.I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E., Molina, R., 2010. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniasis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop.* 115, 95–102.
- Gidwani, K., Picado, A., Rijal, S., Singh, S.P., Roy, L., Volfova, V., Andersen, E.W., Uranw, S., Ostyn, B., Sudarshan, M., Chakravarty, J., Volf, P., Sundar, S., Boelaert, M., Rogers, M.E., 2011. Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: a cluster-randomized trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (9), e1296. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001296>.
- Gomes, R., Oliveira, F., 2012. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on leishmania immunity. *Frontiers Immunol.* 3, 110. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00110>.
- Gomes, R.B., Mendonça, I.L., Silva, V.C., Ruas, J., Silva, M.B., Cruz, M.S., Barral, A., Costa, C.H., 2007. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cercopithecus thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 127–133.
- Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T., Orsini, S., Fiorentino, E., Gradoni, L., 2013. The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009. *Eurosurveillance* 18 (29). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20535> pii=20535.
- Gustafsson, K., Wattang, E., Fossum, C., Heegaard, P.M., Lind, P., Uggla, A., 1997. *Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). II. Early immune reactions. *J. Comp. Pathol.* 117, 361–369.
- Hostomská, J., Rohoušová, I., Volfová, V., Stanneck, D., Mencke, N., Volf, P., 2008. Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8 (4), 443–450. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2007.0214>.
- Jiménez, M., González, E., Iriaso, A., Marco, E., Alegret, A., Fuster, F., Molina, R., 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol. Res.* 112, 2453–2459.
- Killick-Kendrick, M., Killick-Kendrick, R., 1991. The initial establishment of sandfly colonies. *Parassitologia* 33 (Suppl.), 315–320.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobello, M., Gradoni, L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health* 13, 256–264.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M., 2012. An insight into the *Phlebotomus perniciosus* saliva by a proteomic approach. *Acta Trop.* 123, 22–30.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M., 2013. Molecular and immunogenic properties of apyrase SP01B and D7-related SP04 recombinant salivary proteins of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid, Spain. *Biomed. Res. Int.* 2013, 14. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/526069>, Article ID 526069.
- Marzouki, S., Abdeladhim, M., Abdessalem, C.B., Oliveira, F., Ferjani, B., Gilmore, D., Louzir, H., Valenzuela, J.G., Ben Ahmed, M., 2012. Salivary antigen SP32 is the immunodominant target of the antibody response to *Phlebotomus papatasi* bites in humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (11), e1911. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001911>.
- Molina, R., 1991. Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Res. Rev. Parasitol.* 51, 87–89.
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriaso, A., Martín-Martín, I., Sevilano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 190, 268–271.
- Moreno, I., Álvarez, J., García, N., de la Fuente, S., Martínez, I., Marino, E., Toral, A., Goyache, J., Vilas, F., Domínguez, L., Domínguez, M., 2014. Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet. Parasitol.* 199, 264–267.
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M.J., Fisa, R., Castillejo, S., 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev. Iber. Parasitol.* 62, 72–76.
- Rohoušová, I., Ozensoy, S., Ozbek, Y., Volf, P., 2005. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493–499.
- Rohoušová, I., Volf, P., 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol.* 53, 161–171.
- Rohoušová, I., Subrahmanyam, S., Volfová, V., Mu, J., Volf, P., Valenzuela, J.G., Jochim, R.C., 2012. Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1660. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001660>.
- Ruiz-Fons, F., Ferroglio, E., Gortázar, C., 2013. *Leishmania infantum* in free-ranging hares Spain, 2004–2010. *Eurosurveillance* 18 (30). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20541> pii=20541.
- Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millán, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Trisciuglio, A., Gortázar, C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 155, 198–203.
- Souza, A.P., Andrade, B.B., Aquino, D., Entringer, P., Miranda, J.C., Alcántara, R., Ruiz, D., Soto, M., Teixeira, C.R., Valenzuela, J.G., de Oliveira, C.I., Brodskyn, C.I., Barral-Netto, M., Barral, A., 2010. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e649. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000649>.
- Suárez-Rodríguez, B., Isidoro-Fernández, B., Santos-Sanz, S., Sierra-Moros, M.J., Molina-Moreno, R., Astray-Mochales, J., Amela-Heras, C., 2012. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev. Esp. Salud Públ.* 86, 555–564.

- Teixeira, C., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., Seitz, A., Elnaïem, D.E., Caldas, A., de Souza, A.P., Brodskyn, C.I., de Oliveira, C.I., Mendonça, I., Costa, C.H., Volf, P., Barral, A., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2010. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e638, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000638>.
- Vilas, F., Carpintero, J., Sevilla, S., Martínez, A., Ordobás, M., Bernal, J., Díaz, R., Iriso, A., Sevillano, O., Escacena, C., De La Fuente, S., Arce, A., Estirado, A., Frutos, J., Fúster, F., 2012. Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid, Medidas de investigación y control medioambiental. *Prof. Vet.* 17, 6–15.
- Vinhas, V., Andrade, B.B., Paes, F., Bomura, A., Clarencio, J., Miranda, J.C., Bafica, A., Barral, A., Barral-Netto, M., 2007. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Eur. J. Immunol.* 37, 3111–3121.
- Vlková, M., Rohoušová, I., Drahota, J., Stanneck, D., Kruehdewagen, E.M., Mencke, N., Otranto, D., Volf, P., 2011. Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1344, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001344>.
- Vlková, M., Rohoušová, I., Hostomská, J., Pohanková, L., Zidková, L., Drahota, J., Valenzuela, J.G., Volf, P., 2012. Kinetics of antibody response in BALB/c and C57BL/6 mice bitten by *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1719, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001719>.
- Volf, P., Volfova, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J. Vector Ecol.* 36 (Suppl 1), S1–S9, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x>.
- WHO, 2010. Control of the leishmaniasis. In: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva, pp. 186.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

## Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

## Rapid Communication

# Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain?



Maribel Jiménez\*, Estela González, Inés Martín-Martín, Sonia Hernández, Ricardo Molina\*

Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 January 2014

Received in revised form 24 March 2014

Accepted 26 March 2014

## Keywords:

*Phlebotomus perniciosus**Leishmania infantum**Oryctolagus cuniculus*

Xenodiagnosis

Sylvatic cycles

Reservoir

## ABSTRACT

Xenodiagnosis has previously proved that hares (*Lepus granatensis*) from a focus of leishmaniasis in the southwestern Madrid region (Spain) are infective to *Phlebotomus perniciosus*, the only vector in the area, thus playing a probable role as active reservoirs in a sylvatic transmission cycle linked to the usual domestic one. Although actions have been taken to reduce the population of this lagomorph, a high population of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) is present in the area, which shows detectable anti-*Leishmania infantum* antibodies and a large number of individuals with DNA of this parasite. With the aim to elucidate the role of this lagomorph in the focus, xenodiagnostic studies carried out with wild rabbits captured in the area demonstrate that they are able to transmit *L. infantum* to *P. perniciosus*. Moreover, the study of blood meal preferences of *P. perniciosus* caught in the focus during and entomological survey shows strong evidence that rabbits are contributing to the maintenance of a high sand fly population in the area. These findings suggest that wild rabbits could play some role in *Leishmania* transmission.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

In Spain, leishmaniasis is a zoonosis caused by *Leishmania infantum* with the dog as the main domestic reservoir although a number of wild mammals have been found infected (Marín Iniesta et al., 1982; Morillas Márquez et al., 1985; Fisa et al., 1999; Criado-Fornelio et al., 2000; Portús et al., 2002; Sobrino et al., 2008; Chitimia et al., 2011; Millán et al., 2011; Molina et al., 2012; Del Río et al., 2013; Ruiz-Fons et al., 2013).

From July 2009 to date, a leishmaniasis outbreak has occurring in the southwest of the Madrid region, Spain

(Antoniou et al., 2013; Arce et al., 2013) and has already accounted for more than 494 human cases in an area that comprises a population of approximately 500,000 inhabitants, leading to an increased incidence in the area from 2.44 before 2009 to 18.94 per 100,000 inhabitants in 2013. The majority of cases ( $n = 398$ ) comes from the municipality of Fuenlabrada, with an incidence of 44.55 cases per 100,000 inhabitants (data provided by Autonomous Community of Madrid).

A preliminary inspection of the area revealed a large population of hares present in the newly constructed peri-urban green park suggesting that hares could sustain a high sand fly population in the area. In this sense, we have demonstrated for the first time that apparently healthy hares (*Lepus granatensis*) from the focus were able to infect *Phlebotomus perniciosus* by xenodiagnosis studies (Molina et al., 2012). This findings together with recent

\* Corresponding authors. Tel.: +34 91 822 3674; fax: +34 91 509 7034.  
E-mail addresses: [mjimenez@isciii.es](mailto:mjimenez@isciii.es) (M. Jiménez), [rmolina@isciii.es](mailto:rmolina@isciii.es) (R. Molina).



observations on blood meal preferences of *P. perniciosus* captured in the focus and the high prevalence of *L. infantum* infection (58.2%) by PCR approach in *P. perniciosus* ( $n = 135$ ) caught during September–October 2011, support the high transmission events that are taking place in this area, with hares playing an active role as reservoirs in a sylvatic transmission cycle (Molina et al., 2012; Jiménez et al., 2013).

On the other hand, it has been reported that in *Leishmania*-endemic areas as southeastern Spain wild rabbits have a very low risk of developing chronic infection (Chitimia et al., 2011). Recently, it has been shown that rabbits from the focus of Madrid presented detectable anti-*Leishmania* antibodies by an indirect immunofluorescence test (IFAT) and a large number of individuals harbored DNA of this parasite (Moreno et al., 2014). For this reason, wider studies focused in this potential wild reservoir. Simultaneously some control measures were taken, since a high population of wild rabbits is still living in the burrows present in the area. Rabbits are known as highly attractive blood source for *P. perniciosus* (Benito-De Martín et al., 1994). In this sense, using the detection of specific IgG antibodies against both *P. perniciosus* salivary gland homogenate or recombinant salivary proteins, we recently demonstrated that wild rabbits captured in this area ( $n = 21$ ) showed higher anti-saliva antibody levels of exposure to sand fly bites than non-exposed animals indicating that they are frequently bitten by *P. perniciosus* and thus contributing as well to maintaining high population levels of sand flies in the focus (Martín-Martín et al., 2014). Moreover, the entomological surveys conducted in summer of years 2012 and 2013 in four stations of the focus using both CDC and sticky traps determined that *P. perniciosus* is the only vector in the area (66.5%) at high densities (152.6 sand flies/m<sup>2</sup>). In the same study this sand fly is found infected with *L. infantum* in elevated percentages (unpublished data).

Therefore, with the aim to elucidate the role of rabbits in the transmission of *L. infantum* in the focus, xenodiagnostic studies were carried out in wild rabbits captured in this area. Additionally, the blood meal preferences of *P. perniciosus* caught in the focus during the aforementioned entomological surveys were studied.

## 2. Methods

In the frame of the Control Program of Leishmaniasis that is being developed by regional authorities in this area, a total of 48 rabbits were captured in two different sessions – March and October – using Tomahawk rigid live traps baited with green cabbage leaves placed within the perimeter area of the focus of leishmaniasis, Bosquesur, a periurban green park close to the urban area in Fuenlabrada, Madrid (Molina et al., 2012; Arce et al., 2013). Animal handling was in accordance to the standards specified in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals and approved by ethics committees for animal care and experimentation (ISCIII CBBA/4.2-PA 225/08). This work complied with the EU directive on use of wild animals in epidemiological studies and was performed with a special authorization of the competent regional authority of Madrid Community (CM 03/12.597/12) who requested to

the Medical Entomology Unit of the Instituto de Salud Carlos III (MEU, ISCIII), Majadahonda, Spain, this study. Rabbits were anaesthetized with a blend of ketamine (15 mg/kg) and xylazine (2–3 mg/kg) by intramuscular injection. Then, rabbits were bled from the ear by a veterinarian to check *Leishmania* positivity using the rK39 immunochromatographic test (Kalazar Detect® Canine Rapid Test; InBios). Ten apparently healthy rK39 positive rabbits (three males and seven females older than 9 months) were used in the assay. Xenodiagnosis was conducted using a colony of *P. perniciosus* from Madrid reared at the MEU, ISCIII, according to the methodology described previously (Molina et al., 2012). Briefly, anaesthetized rabbits were exposed to 100 sand flies females 8 days old for 1 h. Blood-fed sand flies were kept inside the environmental chamber for 4–7 days until dissections (Fig. 1A–C and Table 1.). When a gut was found to be infected it was gently ruptured with sterile needles, and inoculated in a 1.5 ml screw tube containing 200 µl of M199 culture medium supplemented with 20% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (penicillin/streptomycin) and stored at 28 °C. After 2 or 3 days examination of the tubes was carried out. Flagellates in good conditions (motile promastigotes) were transferred to NNN medium supplemented with RPMI containing 10% FCS and antibiotics (penicillin/streptomycin) for mass culture. This allowed having enough amounts of flagellates for cryopreservation and DNA extraction for further molecular characterization.

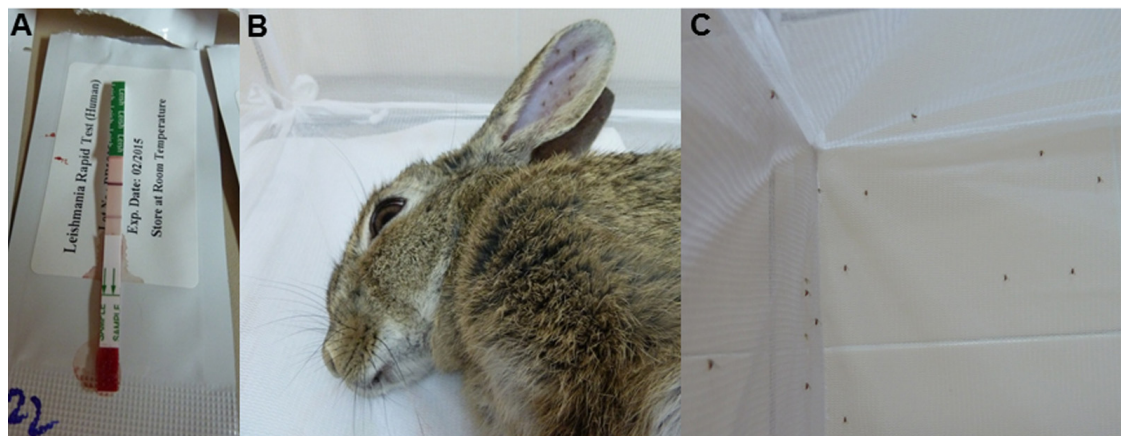
DNA from flagellates was purified using the DNeasy® Blood and Tissue Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Specific *L. infantum* PCR based on *cpb* gene was carried out following previous protocols (Jiménez et al., 2013). Additionally, PCR analysis of ITS1 and ITS2 regions followed by direct sequencing was performed with the aim to characterize the isolates according to Kuhls et al. (2005).

The analysis of blood feeding preferences was carried out in a total of 97 sand flies captured in the focus with CDC traps placed in four stations through two entomological surveys performed during the transmission period from June to September of 2012 ( $n = 70$ ) and 2013 ( $n = 27$ ), respectively. Blood meal identification was conducted by the amplification of a fragment of 359 bp of vertebrate cytochrome *b* (*cyt b*) gene as described before (Jiménez et al., 2013).

## 3. Results

A total of 48 rabbits were captured and 11 animals were rK39 positive representing a 22.9%. Ten rK39 positive apparently healthy rabbits were selected. Xenodiagnosis studies were carried out in 2013 in two different sessions, in March ( $n = 4$  rabbits) and October ( $n = 6$  rabbits). Five out of ten rK39 positive rabbits (50%) were able to infect a mean of 0.94% (0–2%) *P. perniciosus* sand flies (results summarized in Table 1).

Four isolates were successfully grown and DNA extraction was carried out to perform the characterization of flagellates. A specific band of 702 bp was obtained with the PCR based on *cpb* gene confirming the identity of *L. infantum* for the four isolates. After, all the isolates were



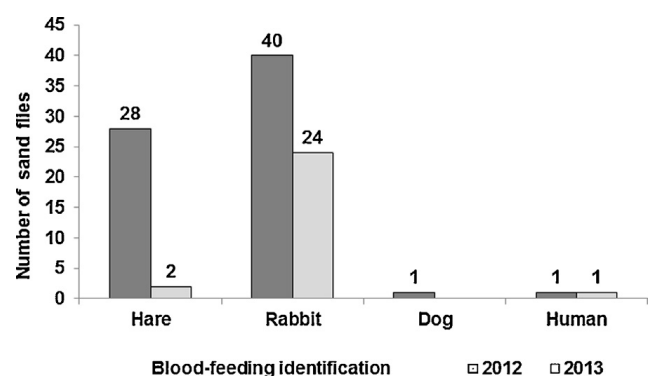
**Fig. 1.** (A) A positive rK39 test from a rabbit. (B) Xenodiagnosis in wild rabbits. (C) Blood fed sand flies.

characterized as *L. infantum* strain MHOM/ES/87/Lombardi according to ITS1 and ITS2 sequences.

Concerning to feeding preferences, identification of blood meal sources were based on the analysis of the sequences obtained on the amplification of 359 bp of *cyt b* gene from 97 *P. perniciosus* female. Data from sand flies captured in 2012 ( $n = 70$ ) reveal that blood meals were mainly from rabbits ( $n = 40$ , 57.1%) following from hares ( $n = 28$ , 40%). A blood source from a human and another from a dog were found in two sand flies representing a 1.43% in each case. Furthermore, in the 27 sand flies processed during 2013 a blood meal from rabbits mostly was identified ( $n = 24$ , 88.9%) and only in two sand flies blood from hares (7.4%) was identified. In one specimen (3.7%) blood from human was detected (see Fig. 2).

#### 4. Discussion

The xenodiagnosis is the best tool to investigate the role of potential reservoirs in the transmission of leishmaniasis. Xenodiagnostic studies have only been applied in a small number of infected wild animals (Quinnell and Courtenay, 2009). For instance, although the existence of *L. infantum* infection in a high proportion of wild carnivores in Spain suggests the existence of a sylvatic cycle of leishmaniasis independent of domestic dogs (Sobrino et al., 2008; Del Río et al., 2013), xenodiagnostic studies have not been carried



**Fig. 2.** Blood meal identification in fed females caught in years 2012 and 2013 in different stations in the area.

out to confirm this suggestion. Regarding to studies on the role of lagomorphs as reservoirs of leishmaniasis, it was demonstrated for the first time that apparently healthy naturally infected hares are able to transmit the parasite (Molina et al., 2012). A retrospective survey on spleen samples ( $n = 94$ ) from hares collected from 2004 to 2010 in six geographic regions of Spain showing a high presence (43.6%) of *L. infantum* DNA confirm that hares can play an unexpected role in the epidemiology of *L. infantum* in Spain (Ruiz-Fons et al., 2013).

In the present work, the results obtained by xenodiagnosis in 10 rK39 positive wild rabbits captured in the area

**Table 1**

Xenodiagnosis of rK39 positive rabbits after the exposed to 100 *Phlebotomus perniciosus* female 8 day old.

Date	Rabbit code	No. of fed sand flies	No. of dissected sand flies (%)	Total no. of positive sand flies (%)	Strain identification
04/03/13	1XC13	48	33 (68.7)	0	–
	2XC13	99	83 (83.8)	0	–
	3XC13	86	65 (75.5)	1 (1.54)	<i>L. infantum</i>
	4XC13	72	54 (75)	1 (1.85)	<i>L. infantum</i>
09/10/13	5XC13	57	50 (87.7)	1 (2)	ND
	6XC13	67	45 (67.2)	0	–
	7XC13	71	61 (85.9)	1 (1.64)	<i>L. infantum</i>
	8XC13	36	23 (63.9)	0	–
	9XC13	90	53 (58.9)	1 (1.89)	<i>L. infantum</i>
	10XC13	80	64 (80)	0	–
<b>TOTAL</b>		706	531 (75.2%)	5 (0.94%)	

ND, not determined.

of the outbreak proved that they can infect sand flies contributing to the transmission of the disease although in a lesser degree than hares. Recent studies in the south-eastern Spain, based on both seroprevalence and PCR analysis, suggest that wild rabbits – the most abundant lagomorphs in Spain – have a very low risk of becoming infected with *L. infantum* suggesting that rabbits are not an important reservoir of *L. infantum* infection (Chitimia et al., 2011). Nevertheless, a recent study on seroprevalence of leishmaniasis among lagomorphs performed in the focus of Madrid shows that 45.7% of rabbits and 74.1% of hares have anti-*Leishmania* antibodies and that the percentage of hares with high levels of antibodies is greater than in rabbits (Moreno et al., 2014). PCR analysis carried out in lagomorphs from the same focus indicates that 8.6% of rabbits and 43.5% of hares have DNA from *L. infantum* (Moreno et al., 2014). On the other hand, rabbits were also infective in March to *P. perniciosus* – the main vector in the western Mediterranean – proving that chronic infection long-lasting through the non-transmission period as occurs with hares (Molina et al., 2012). Moreover, the relative infectiousness to the vector of sympatric hosts (rabbits and hares) in this focus supports their incrimination as reservoirs although additional studies are required (Quinnell and Courtenay, 2009).

In relation to the results of blood meal identification, although the number of specimens studied was higher in 2012 ( $n = 70$ ) than in 2013 ( $n = 27$ ), the data reveal an important increase in the number of sand flies fed on rabbits during sand fly season. This can be a direct consequence of the control measures undertaken all over 2012 that significantly reduced the number of hares in the green park close to the urban area of the outbreak. Thus, between December 2011 and February 2013, about 1200 hares were captured in the park representing a high population density of 265 hares/km<sup>2</sup> (Suárez-Rodríguez et al., 2012; Antoniou et al., 2013). In the absence of hares it appears to take place a change in the food preferences of sand flies from the park being now the rabbit its main source of blood. Therefore, this lagomorph takes on particular interest now that it has been shown that they can transmit the parasite to the vector in a range of 0–2%, although in low proportion that hares with a range of 0–10.6% *P. perniciosus* infected (Molina et al., 2012). Interestingly, *L. infantum* MHOM/ES/87/Lombardi, strain previously confirmed as responsible of leishmaniasis cases in the outbreak (Molina et al., 2012; Chicharro et al., 2013; Jiménez et al., 2013) it is present in rabbits too supporting that this lagomorph can play some role in the outbreak.

According with the results obtained in this work we provide for the first time evidence on the infectivity of apparently healthy *L. infantum* infected wild rabbits from the focus to phlebotomine sand flies. This significant information together with the high rates of sand flies caught in the focus fed in rabbits and the identification of the same strain of *L. infantum* circulating in rabbits and sand flies supports the possible role of another potential sylvatic reservoir – the rabbit – in the focus of Madrid, although with a quite minor contribution than hares in the spread of leishmaniasis, in this and other scenarios with similar environmental and ecological characteristics. Another

important fact to be considered is the absence of dogs and other wild canids such as foxes in the park where the hares and rabbits were captured.

We are facing an exceptional scenario consisting of a large green area, where a wild cycle of leishmaniasis is being developed, which is almost completely surrounded by large urban densely populated areas where the dog is the domestic reservoir of the disease. This situation seems to be the cause of the urbanization of the disease. Indeed, it could be possible the existence of peridomestic and sylvatic transmission cycles acting simultaneously involving different reservoir species – domestic and sylvatic – with a common link, the sand fly vector (Quinnell and Courtenay, 2009).

The work presented herein is another example of the complexity of the eco-epidemiological factors that drive the leishmaniasis and the great attention should be paid to the study of wild reservoirs of the disease.

### Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

### Acknowledgments

We thank the General Directorate of Management and Inspection, Department of Surveillance of Environmental Risk in Health, Ministry of Health of the Community of Madrid (CM) by providing rabbits. Our gratitude to Gregorio Pintor from Leganes Council for his support in organizing the collection of rabbits. We would like also to thank Felipe Vilas, Fernando Fúster y Andrés Iriso from the Dirección General de Ordenación e Inspección, Consejería de Sanidad, (CM) and Jesús Carpintero from the Dirección General de Medio Ambiente, Consejería de Medio ambiente y Ordenación del Territorio, (CM). This study was partially sponsored and funded by the Dirección General de Ordenación e Inspección, Consejería de Sanidad (CM) and the Colegios de Veterinarios and Biólogos de Madrid. This study was partially funded by EU grant FP7-2011-261504 EDENext and the paper is cataloged by the EDENext Steering Committee as EDENext 211 (<http://www.edenext.eu>).

### References

- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., Volf, P., 2013. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill.* 18 (30), pii: 20540. Available on line: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20540>
- Arce, A., Estirado, A., Ordobás, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A.M., Pérez, A.M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F., 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 18 (30), pii: 20546. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20546>
- Benito-De Martín, M.I., Gracia-Salinas, M.J., Molina-Moreno, R., Ferrer-Dufol, M., Lucientes-Curdi, J., 1994. *Influence de la nature du sang ingéré sur les paramètres gonotrophiques de Phlebotomus perniciosus sous conditions de laboratoire.* *Parasite (Paris, France)* 1, 409–411.
- Chicharro, C., Llanes-Acevedo, I.P., García, E., Nieto, J., Moreno, J., Cruz, I., 2013. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 18 (30), pii: 20545. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20545>



- Chitimia, L., Muñoz-García, C.I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., del Río, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Giménez-Font, P., Jiménez-Montalbán, P., Martínez-Ramírez, A., Meseguer-Meseguer, J.M., García-Bacete, I., Sánchez-Isarria, M.A., Sanchis-Monsonís, G., García-Martínez, J.D., Vicente, V., Segovia, M., Berriatua, E., 2011. Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 181, 12–16.
- Criado-Fornelio, A., Gutiérrez-García, L., Rodríguez-Caabeiro, F., Reus-García, E., Roldán-Soriano, M.A., Díaz-Sánchez, M.A., 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.* 92, 245–251.
- Del Río, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De la Rúa, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Muñoz-García, C.I., Goyena, E., García-Martínez, D., Fisa, R., Riera, C., Murcia, L., Segovia, M., Berriatua, E., 2013. Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Prev. Vet. Med.*, 17, <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.12.001>, pii: S0167-5877(13)00366-8.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87–97.
- Kuhls, K., Mauricio, I.L., Pratlong, F., Presber, W., Schöni, G., 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* 7, 1224–1234.
- Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F., Molina, R., 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol. Res.* 112, 2453–2459.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Rohoušová, I., Drahota, J., Volf, P., Jiménez, M., 2014. High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain. *Vet. Parasitol.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.045>.
- Marín Iniesta, F., Marín Iniesta, E., Martín Luengo, F., 1982. Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la región murciana. Resultados preliminares. *Rev. Ibér. Parasitol.* 42, 307–313.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E., 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound Emerg. Dis.* 58, 352–357.
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevilano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 190, 268–271.
- Moreno, I., Álvarez, J., García, N., de la Fuente, S., Martínez, I., Marino, E., Toraño, A., Goyache, J., Vilas, F., Domínguez, L., Domínguez, M., 2014. Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet. Parasitol.* 199, 264–267.
- Morillas Márquez, F., Benavides Delgado, I., González Castro, J., Reyes Magaña, A., Valero López, A., 1985. Occurrence of *Leishmania* sp. in *Rattus rattus* in the province of Granada. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60, 768–770.
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M.J., Fisa, R., Castillejo, S., 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev. Ibér. Parasitol.* 62, 72–76.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915–1934.
- Ruiz-Fons, F., Ferroglio, E., Gortázar, C., 2013. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004–2010. *Euro Surveill.* 18 (30), pii: 20541. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20541>
- Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millán, J., Revilla, M., Arnal, M.C.M.C., Trisciuglio, A., Gortázar, C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 155, 198–203.
- Suárez-Rodríguez, B., Isidoro-Fernández, B., Santos-Sanz, S., Sierra-Moros, M.J., Molina-Moreno, R., Astray-Mochales, J., Amela-Heras, C., 2012. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev. Esp. Salud Púb.* 86, 555–564.